



**Sílvia Daniela Costa
Vale**

**Uma abordagem epigenética à determinação da
idade de amostras biológicas: potenciais aplicações
forenses**

DECLARAÇÃO

Declaro que este relatório é integralmente da minha autoria, estando devidamente referenciadas as fontes e obras consultadas, bem como identificadas de modo claro as citações dessas obras. Não contém, por isso, qualquer tipo de plágio quer de textos publicados, qualquer que seja o meio dessa publicação, incluindo meios eletrônicos, quer de trabalhos acadêmicos.



**Sílvia Daniela Costa
Vale**

**Uma abordagem epigenética à determinação da
idade de amostras biológicas: potenciais aplicações
forenses**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Molecular e Celular, realizada sob a orientação científica do Doutor Luís Manuel Souto de Miranda, Professor Auxiliar Convidado do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro.

o júri

Presidente

Prof. Doutora Maria de Lourdes Gomes Pereira
Professora Associada com Agregação da Universidade de Aveiro

Prof. Doutora Bárbara da Silva Rocha
Investigadora de Pós-Doutoramento da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

Prof. Doutor Luís Manuel Souto de Miranda
Professor Auxiliar Convidado da Universidade de Aveiro

Agradecimentos

Ao meu Orientador, Professor Luís Souto, pela oportunidade de integrar a sua equipa de investigação do Laboratório de Genética Aplicada do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro e pelo incansável apoio.

À Filipa e à Helena pelos sábios conselhos transmitidos e pela disponibilidade e paciência que sempre tiveram comigo, além das vossas palavras de ânimo.

À Rafaela pelos bons momentos que passamos neste longo percurso e pela cumplicidade que partilhamos.

À Juliana pelo companheirismo, força e apoio. Muita coragem para o que aí vem.

Aos voluntários que forneceram o material biológico, sem o qual este trabalho não teria sido possível.

A todos os meus colegas de laboratório.

Aos meus pais por serem modelos de coragem. Pela incansável paciência e apoio que me transmitiram na superação dos vários obstáculos. Foram essenciais.

Palavras-chave

Epigenética, Metilação do ADN, Idade, *qPCR*, *High-Resolution Melting* (HRM), Genética Forense.

Resumo

Ao longo do tempo de vida, um processo estocástico influenciado pela hereditariedade, fatores ambientais, estilo de vida e doenças conduz a alterações graduais de biomoléculas ao nível molecular e celular – o envelhecimento. Estas alterações podem auxiliar em investigações forenses na determinação da idade de indivíduos e, respetiva identificação, por métodos morfológicos, bioquímicos e moleculares. Contudo, estes marcadores biológicos possuem baixa precisão na estimativa da idade e inúmeras limitações práticas.

Uma das modificações epigenéticas que está amplamente correlacionada com a idade é a metilação do ADN, uma vez que os níveis de metilação globais diminuem ao longo do envelhecimento. Desta forma, foram analisados os padrões de metilação de promotores de genes, no sentido de criar um modelo robusto de previsão da idade.

Neste estudo, avaliamos a introdução de uma nova abordagem na análise do estado de metilação de três *loci* (EDARADD, NPTX2 e TOM1L1) – a *High-Resolution melting*. Inicialmente, foi realizada uma otimização desta metodologia, pela avaliação dos métodos de extração do ADN e dos *kits* de conversão testados. Estas etapas revelaram ser fatores-chave para a correta análise dos padrões de metilação por HRM num conjunto de amostras estudadas. Esta metodologia permitiu diferenciar as amostras, segundo o estado de metilação dos referidos marcadores, em grupos etários, revelando alguma imprecisão desta técnica para a estimativa da idade. Por último, foi avaliada a metilação global de ADN genómico de uma pequena amostragem, na qual se comprovou a sua diminuição durante o processo de envelhecimento.

Keywords

Epigenetics, DNA methylation, Age, qPCR, High-Resolution Melting (HRM), Forensic Genetics.

Abstract

Throughout the lifetime, a stochastic process influenced by heredity, environment, lifestyle and disease leads to gradual alterations of biomolecules at molecular and cellular levels – aging. These changes can aid in forensic investigations to estimate the age of individuals and their identification by morphological, biochemical and molecular methods. However, all of these biomarkers have low precision and practical limitations. One of these epigenetic modifications has been correlated with age is DNA methylation, which global level of methylation decreases as a person ages. Therefore, several studies have analyzed the methylation patterns of gene promoters to create a robust model for predicting age.

In this study, we evaluated new approach to the analysis of methylation status of three *loci* (EDARADD, NPTX2 and TOM1L1) – High-Resolution Melting. Firstly, we performed an optimization of this methodology by evaluation of DNA extraction methods and conversion kits. These steps have proven to be key factors for the proper analysis of methylation patterns in a set of samples by HRM. According to methylation status of three markers, this methodology allowed the differentiation of samples in age groups, revealing some technical inaccuracy to estimate age. Lastly, we evaluated the overall methylation of genomic DNA in a sampling and we testified its decrease during the aging process.

Abreviaturas

% - Percentagem

μL – Microlitro

°C – Graus Celsius

5-mC – 5-metilcitosina

A – Adenina

A – Amperes

ADN – Ácido desoxirribonucleico

AGEs – Produtos finais de glicação avançada

ARN – Ácido ribonucleico

ATP – Adenosina trifosfato

C – Citosina

CGI – Ilhas CpG

Cq – Ciclos de amplificação

DNMTs – ADN metiltransferases

dNTP – Desoxinucleótidos Tri-Fosfato

dsADN – ADN de cadeia dupla

ELISA – Ensaio Imunoenzimático

G – Guanina

g – Grama

gADN – ADN Genómico

HRM – do inglês *High-resolution melting*

LCLs – Linha celular de linfoblastóides

mARN – ARN mensageiro

mg – Miligramas

miARN – Micro ARN

mL – Mililitros

mtADN – ADN mitocondrial

ng – Nanogramas

OD – Densidade ótica

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase

pb - Pares de Base

pg - Picogramas

qPCR – PCR em Tempo Real

RFU – Unidade Relativa de Fluorescência

sjTRECs – do inglês *Signal joint TCR excision circles*

SNP – Polimorfismo de Nucleótido único

ssADN – ADN de cadeia única

T – Temperatura

T – Timina

tDMRs – do inglês *Tissue-specific differentially methylated regions*

TE – Tris-EDTA

Tm – Temperatura de *melting*

TRF – Fragmento de restrição terminal dos telómeros

V – Voltagem

Índice

| | |
|---|-----------|
| 1. Introdução..... | 1 |
| 1.1. Epigenética..... | 1 |
| 1.1.1. Metilação do ADN..... | 2 |
| 1.1.1.1. A metilação do ADN e a expressão genética..... | 3 |
| 1.1.1.2. A metilação do ADN e a influência ambiental..... | 4 |
| 1.1.1.3. A aplicação da metilação do ADN nas Ciências Forenses..... | 5 |
| 1.1.1.3.1. Verificação da veracidade de amostras de ADN..... | 5 |
| 1.1.1.3.2. Identificação de fluídos biológicos/tecidos..... | 6 |
| 1.1.1.3.3. Determinação do género..... | 7 |
| 1.1.1.3.4. Marcadores informativos da ancestralidade de fluídos/tecidos e associação com doenças..... | 7 |
| 1.1.1.3.5. Discriminação de gémeos monozigóticos..... | 7 |
| 1.1.1.3.6. Determinação da origem parental dos alelos..... | 8 |
| 1.1.1.3.7. Determinação da causa e circunstâncias da morte..... | 8 |
| 1.2. O Envelhecimento..... | 9 |
| 1.2.1. A idade..... | 9 |
| 1.2.1.1. A importância da determinação da idade..... | 10 |
| 1.2.1.2. Biomarcadores de determinação da idade..... | 10 |
| 1.2.1.2.1. Biomarcadores baseados em alterações proteicas..... | 11 |
| 1.2.1.2.1.1. Racemização aminoacídica – racemização do ácido aspártico..... | 11 |
| 1.2.1.2.1.2. Acumulação de produtos finais de glicação avançada (AGEs)..... | 11 |
| 1.2.1.2.2. Biomarcadores baseados em alterações moleculares..... | 12 |
| 1.2.1.2.2.1. Deleção mitocondrial – quantificação da deleção 4977 pb..... | 12 |
| 1.2.1.2.2.2. Telómeros – determinação do comprimento dos telómeros..... | 13 |
| 1.2.1.2.2.3. Rearranjos de genes somáticos – quantificação de sjTRECS..... | 13 |
| 1.2.1.2.2.4. Biomarcadores de ARN..... | 14 |
| 1.2.1.2.3. A Epigenética e a estimativa da idade..... | 14 |
| 1.2.1.3. Métodos de estimativa da idade com base no ADN metilado..... | 17 |
| 1.2.1.3.1. Conversão do ADN pelo método de bissulfito..... | 18 |
| 1.2.1.3.1.1. PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)..... | 19 |
| 1.2.1.3.1.1.1. Sequenciação..... | 21 |
| 1.2.1.3.1.1.2. Pirosequenciação..... | 22 |
| 1.2.1.3.1.1.3. PCR em Tempo Real (qPCR)..... | 23 |
| 1.2.1.3.1.1.3.1. Análise HRM (<i>High-Resolution Melting Analysis</i>)..... | 23 |
| 2. Objetivos..... | 27 |

| | |
|---|-----------|
| 3. Material e Métodos..... | 29 |
| 3.1. Amostragem populacional e Recolha de ADN | 29 |
| 3.2. Extração de ADN | 30 |
| 3.2.1. Protocolos de extração de ADN..... | 30 |
| 3.2.1.1. Extração de ADN através do protocolo para a purificação de ADN através do <i>kit</i> de recolha <i>Oragene® DNA</i> (DNA Genotek) | 30 |
| 3.2.1.2. Extração de ADN pelo método de Fenol-Clorofórmio..... | 30 |
| 3.2.1.3. Extração de ADN pelo método adaptado de Chelex® 100..... | 31 |
| 3.3. Quantificação e Análise da pureza do ADN extraído | 31 |
| 3.3.1. Quantificação do ADN por Fluorimetria (Qubit™)..... | 31 |
| 3.3.2. Quantificação e avaliação da pureza (NanoDrop™ 1000)..... | 32 |
| 3.4. Conversão do ADN pelo método de bissulfito..... | 33 |
| 3.4.1. Protocolos de Conversão de ADN | 33 |
| 3.4.1.1. Conversão do ADN através do protocolo do <i>kit EpiJET Bisulfite Conversion</i> (Thermo Scientific).. | 33 |
| 3.4.1.2. Conversão do ADN através do protocolo do <i>kit EZ DNA Methylation-Gold™</i> (Zymo Research)..... | 34 |
| 3.5. Amplificação do ADN convertido | 34 |
| 3.5.1. Amplificação do ADN com o <i>kit</i> de amplificação <i>Taq PCR Core kit</i> (Qiagen) | 35 |
| 3.5.2. Amplificação do ADN com <i>kit</i> de amplificação <i>Luminaris Color HRM Master Mix</i> (Thermo Scientific) | 36 |
| 3.6. Electroforese em gel de agarose (2 %)..... | 38 |
| 3.7. Análise HRM | 39 |
| 3.8. Quantificação do estado global de metilação das amostras com o <i>kit MethylFlash™ Methylated DNA Quantification – Colorimetric</i> (EPIGENTEK)..... | 39 |
| 4. Resultados e Discussão..... | 41 |
| 4.1. Otimização da metodologia de determinação da idade do material biológico | 41 |
| 4.1.1. Avaliação do ADN extraído das amostras | 41 |
| 4.1.2. Análise da concentração e pureza do ADN extraído (pós-modificação por bissulfito)..... | 45 |
| 4.1.3. Avaliação da viabilidade da amplificação e análise HRM | 48 |
| 4.1.3.1. Marcador EDARADD | 48 |
| 4.1.3.2. Marcador NPTX2 | 51 |
| 4.1.3.3. Marcador TOM1L1 | 53 |
| 4.2. Avaliação das metodologias para a determinação da idade de amostras biológicas | 56 |
| 4.2.1. Avaliação da metodologia para a determinação da idade de amostras biológicas recolhidas por <i>Oragene® DNA</i> (DNA Genotek) | 57 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 4.2.1.1. | Avaliação do ADN extraído das amostras biológicas recolhidas por Oragene [®] DNA/saliva (DNA Genotek) | 57 |
| 4.2.1.2. | Análise da concentração e pureza do ADN extraído (pós-modificação por bissulfito) | 58 |
| 4.2.1.3. | Avaliação da viabilidade da amplificação e análise HRM | 59 |
| 4.2.1.3.1. | Marcador EDARADD | 59 |
| 4.2.1.3.2. | Marcador NPTX2 | 59 |
| 4.2.1.3.3. | Marcador TOM1L1 | 60 |
| 4.2.2. | Validação da metodologia para a determinação da idade de amostras biológicas recolhidas por <i>OmniSwabTM</i> (Whatman [®]) e extraídas pelo método adaptado de Chelex [®] 100 | 61 |
| 4.2.2.1. | Avaliação do ADN extraído das amostras biológicas recolhidas por <i>OmniSwabTM</i> (Whatman [®]) | 61 |
| 4.2.2.2. | Análise da concentração e pureza do ADN extraído (pós-modificação por bissulfito) | 62 |
| 4.2.2.3. | Avaliação da viabilidade da amplificação e análise HRM | 64 |
| 4.2.2.1.1. | Marcador EDARADD | 64 |
| 4.2.2.1.2. | Marcador NPTX2 | 64 |
| 4.2.2.1.3. | Marcador TOM1L1 | 65 |
| 4.2.3. | Avaliação do estado de metilação global do ADN das amostras biológicas | 66 |
| 5. | Conclusões | 71 |
| 6. | Bibliografia | 73 |
| | Anexos | 81 |
| | Anexo I – Consentimento informado utilizado na recolha de amostras | 81 |
| | Anexo II – Proposta de Artigo | 83 |

Índice de Figuras

| | |
|--|----|
| Figura 1 - Exemplo da metilação do ADN numa citosina. Adaptado de Vidaki et al. (2013)..... | 2 |
| Figura 2 - Esquema da metilação de citosinas num contexto CpG. Adaptado de Patterson et al. (2011) | 3 |
| Figura 3 - Representação esquemática do mecanismo de regulação de genes. Adaptado de Vidaki et al. (2013) | 4 |
| Figura 4 - Representação esquemática das várias técnicas de análise da metilação do ADN. Adaptado de Kurdyukov et al. (2016) | 17 |
| Figura 5 - Síntese esquemática da conversão química pelo método de bissulfito. Adaptado de Patterson et al. (2011) | 19 |
| Figura 6 - Representação esquemática do princípio da PCR e das suas etapas. Adaptado de Carriço et al. (2013) | 20 |
| Figura 7 - Representação esquemática de exemplos de resultados a obter por sequenciação. Adaptado de Tollefsbol (2004)..... | 21 |
| Figura 8 - Esquema representativo da análise de resultados da pirosequenciação. Adaptado de Shen et al. (2007) | 22 |
| Figura 9 - Exemplo de uma curva de <i>melting</i> . Adaptado de Worm et al. (2001) | 24 |
| Figura 10 - Processo de libertação de corantes não saturados (A) e saturados (B), durante a dissociação das cadeias de ADN. Adaptado de Sun et al. (2016) | 24 |
| Figura 11 - Gráfico representativo do rendimento obtido através dos quatros métodos de recolha/extração.. | 44 |
| Figura 12 - Gráfico representativo da pureza do ADN extraído por quatro métodos de recolha/extração | 44 |
| Figura 13 - Gráfico representativo dos rendimentos de ADN obtidos após a extração segundo os diferentes métodos de recolha/extração e após a conversão pelos <i>kits</i> comerciais <i>EpiJET Bisulfite Conversion</i> (Thermo Scientific) e <i>EZ DNA Methylation-Gold™</i> (Zymo Research) | 48 |
| Figura 14 - Gráfico representativo das curvas de amplificação das amostras biológicas para o marcador EDARADD | 49 |
| Figura 15 - Gráfico representativo das curvas de <i>melting</i> das amostras biológicas para o marcador EDARADD | 50 |
| Figura 16 - Avaliação da amplificação por PCR convencional das amostras para o marcador NPTX2 | 51 |
| Figura 17 - Gráfico representativo das curvas de amplificação das amostras biológicas para o marcador NPTX2 | 51 |
| Figura 18 - Gráfico representativo das curvas de <i>melting</i> das amostras biológicas para o marcador NPTX2. | 52 |
| Figura 19 - Avaliação da amplificação por PCR convencional das amostras para o marcador TOM1L1..... | 53 |

| | |
|---|----|
| Figura 20 - Gráfico representativo das curvas de amplificação das amostras biológicas para o marcador TOM1L1..... | 54 |
| Figura 21 - Gráfico representativo das curvas de <i>melting</i> das amostras biológicas para o marcador TOM1L1 | 55 |
| Figura 22 - Gráfico representativo dos rendimentos do ADN obtidos após a extração pelo método Oragene [®] DNA/saliva (DNA Genotek) e conversão pelo <i>kit</i> comercial <i>EZ DNA Methylation-Gold[™]</i> (Zymo Research) das amostras | 58 |
| Figura 23 - Gráfico representativo dos rendimentos do ADN obtidos após a extração pelo método adaptado de Chelex [®] 100 e conversão pelo <i>kit</i> comercial <i>EZ DNA Methylation-Gold[™]</i> (Zymo Research)..... | 63 |
| Figura 24 - Curva padrão da metilação global dos controlos e respetiva reta obtida por regressão linear e sua equação..... | 67 |
| Figura 25 - Equações para a quantificação absoluta de ADN metilado..... | 67 |
| Figura 26 - Gráfico representativo da concentração de metilação do ADN extraído pelo método Oragene [®] DNA/saliva (DNA Genotek), nas respetivas amostras biológicas..... | 68 |
| Figura 27 - Gráfico representativo da concentração de metilação do ADN extraído pelo método adaptado de Chelex [®] 100, nas respetivas amostras biológicas | 69 |

Índice de Tabelas

| | |
|--|----|
| Tabela 1 - <i>Locus</i> identificados como biomarcadores da idade, em populações humanas, por alterações nos padrões de metilação do ADN nos seus promotores durante o envelhecimento | 16 |
| Tabela 2 - Métodos de recolha/armazenamento e extração utilizados..... | 29 |
| Tabela 3 - Constituintes e respetivos volumes necessários na preparação da <i>Master Mix</i> com o <i>kit</i> de amplificação <i>Taq PCR Core kit</i> (Qiagen)..... | 35 |
| Tabela 4 - Informações relativas aos <i>primers</i> dos promotores dos genes NPTX2 e TOM1L1: a sua identificação, sequência, tamanho do fragmento produzido, temperatura de <i>annealing</i> e indicação da sua referência bibliográfica..... | 35 |
| Tabela 5 - Condições de amplificação do ADN segundo o <i>kit</i> de amplificação <i>Taq PCR Core kit</i> (Qiagen) . | 36 |
| Tabela 6 - Constituintes e respetivos volumes necessários na preparação da <i>Master Mix</i> do <i>kit</i> de amplificação <i>Luminaris Color HRM Master Mix</i> (Thermo Scientific) | 37 |
| Tabela 7 - Informações relativas aos <i>primers</i> dos promotores dos genes EDARADD, NPTX2 e TOM1L1: a sua identificação, sequência, tamanho do fragmento produzido, temperatura de <i>annealing</i> e indicação da sua referência bibliográfica..... | 37 |
| Tabela 8 - Condições de amplificação do ADN segundo o <i>kit</i> de amplificação <i>Luminaris Color HRM Master Mix</i> (Thermo Scientific) | 38 |
| Tabela 9 - Preparação dos controlos positivos para a curva <i>standard</i> | 39 |
| Tabela 10 - Valores da quantificação do ADN extraído pelo método Oragene [®] DNA/saliva (DNA Genotek) | 41 |
| Tabela 11 - Valores da quantificação do ADN recolhido por <i>OmniSwab</i> TM (Whatman [®]) e extraído pelo método Fenol-Clorofórmio..... | 42 |
| Tabela 12 - Valores da quantificação do ADN recolhido por <i>OmniSwab</i> TM (Whatman [®]) e extraído pelo método Chelex [®] 100..... | 42 |
| Tabela 13 - Valores da quantificação do ADN recolhido por <i>FTA</i> [®] <i>Classic Cards</i> (Whatman [®]) e extraído pelo método Chelex [®] 100 | 43 |
| Tabela 14 - Dados da quantificação do ADN convertido e extraído pelo método Oragene [®] DNA/saliva (DNA Genotek)..... | 45 |
| Tabela 15 - Dados da quantificação do ADN convertido e extraído pelo método de Fenol-Clorofórmio de um <i>OmniSwab</i> TM (Whatman [®])..... | 46 |
| Tabela 16 - Dados da quantificação do ADN convertido e recolhido por <i>OmniSwab</i> TM (Whatman [®]) e extraído pelo método Chelex [®] 100..... | 46 |
| Tabela 17 - Dados da quantificação do ADN convertido e recolhido por <i>FTA</i> [®] <i>Classic Cards</i> (Whatman [®]) e extraído pelo método Chelex [®] 100..... | 47 |

| | |
|--|----|
| Tabela 18 - Tabela dos dados correspondentes às curvas de amplificação das amostras biológicas para o marcador EDARADD | 49 |
| Tabela 19 - Tabela dos dados correspondentes à análise HRM para o marcador EDARADD | 50 |
| Tabela 20 - Tabela dos dados correspondentes às curvas de amplificação das amostras biológicas para o marcador NPTX2 | 52 |
| Tabela 21 - Tabela dos dados correspondentes à análise HRM para o marcador NPTX2 | 53 |
| Tabela 22 - Tabela dos dados correspondentes às curvas de amplificação das amostras biológicas para o marcador TOM1L1..... | 54 |
| Tabela 23 - Tabela dos dados correspondentes à diferenciação das amostras por análise HRM para o marcador TOM1L1..... | 55 |
| Tabela 24 - Valores da quantificação do ADN extraído pelo método Oragene® DNA/saliva (DNA Genotek) | 57 |
| Tabela 25 - Dados da quantificação do ADN convertido e extraído pelo método Oragene® DNA/saliva (DNA Genotek)..... | 58 |
| Tabela 26 - Tabela dos dados correspondentes à diferenciação das amostras por análise HRM para o marcador EDARADD | 59 |
| Tabela 27 - Tabela dos dados correspondentes à diferenciação das amostras por análise HRM para o marcador NPTX2 | 60 |
| Tabela 28 - Tabela dos dados correspondentes à diferenciação das amostras por análise HRM para o marcador TOM1L1..... | 61 |
| Tabela 29 - Valores da quantificação do ADN extraído pelo método adaptado de Chelex® 100 das amostras | 62 |
| Tabela 30 - Dados da quantificação do ADN convertido e extraído pelo método adaptado de Chelex® 100.. | 63 |
| Tabela 31 - Tabela dos dados correspondentes à diferenciação das amostras por análise HRM para o marcador EDARADD | 64 |
| Tabela 32 - Tabela dos dados correspondentes à diferenciação das amostras por análise HRM para o marcador NPTX2 | 65 |
| Tabela 33 - Tabela dos dados correspondentes à diferenciação das amostras por análise HRM para o marcador TOM1L1..... | 65 |
| Tabela 34 - Dados obtidos para a elaboração da curva padrão da metilação global e respetivo declive da reta | 66 |
| Tabela 35 - Dados obtidos relativamente ao estado de metilação global do ADN extraído pelo método Oragene® DNA/saliva (DNA Genotek)..... | 68 |

Tabela 36 - Dados obtidos relativamente ao estado de metilação global do ADN recolhido *OmniSwabTM* (Whatman[®]) extraído pelo método adaptado de Chelex[®] 100. 69

1. Introdução

1.1. Epigenética

O termo Epigenética foi introduzido por Conrad Waddington, em 1942, para descrever as interações entre a Genética e o ambiente que estão na origem dos fenótipos durante o desenvolvimento (Waddington 2012). Esta área estuda as modificações somáticas hereditárias na expressão genética que ocorrem sem alteração da sequência de ADN. A combinação destas alterações modula e estabelece diferentes perfis de expressão genética a partir do mesmo genoma.

A regulação epigenética abrange vários níveis de expressão genética e envolve modificações no genoma com consequências funcionais. Os principais mecanismos epigenéticos são a metilação do ADN e a modificação das histonas. Para além destes, estão também descritos os complexos de remodelação da cromatina baseados em ATP, os complexos de proteínas *Polycomb-Trithorax*, o ARN não-codificante, os priões, a ligação de fatores de transcrição e outros processos envolvidos na manutenção da estrutura da cromatina e a ligação à matriz nuclear (Bell and Spector 2011; Triantaphyllopoulos, Ikononopoulos, and Bannister 2016).

Os padrões epigenéticos são preservados durante a divisão celular, tal como a sequência de ADN, contudo estes podem ser alterados ao longo do tempo de vida do indivíduo (Bird 2002). O estudo das modificações epigenéticas induzidas por fatores ambientais serviu de mote para os primeiros estudos realizados em gémeos, com o intuito de explorar o aumento da variação epigenética ao longo do envelhecimento (Fraga et al. 2005; Bell and Spector 2011). As alterações epigenéticas ocorrem em resposta à exposição ambiental a vários fatores, por exemplo a dieta alimentar e os hábitos tabágicos (Rando and Verstrepen 2007).

As alterações na expressão génica podem ser programadas ou induzidas por fatores ambientais. As modificações epigenéticas programadas ocorrem em organismos complexos, onde todas as células contêm a mesma informação genética, porém, cada tipo de célula possui um padrão de expressão genética programado para a respetiva diferenciação e, consequente função específica (Fraga et al. 2005; Grundberg et al. 2013; Lardenoije et al. 2015). As alterações epigenéticas podem apresentar um comportamento estável nas células, como verificado no *imprinting* e na inativação do cromossoma X; ou dinâmico pelo silenciamento de genes e possível desenvolvimento de carcinogénese em diferentes tipos de tecidos (Rando and Verstrepen 2007).

1.1.1. Metilação do ADN

Os mecanismos epigenéticos estão presentes em muitas *taxa*, porém a metilação do ADN tem sido mais estudada em mamíferos, sendo esta uma marca epigenética de enorme importância no desenvolvimento e diferenciação celular (Kader and Ghai 2015).

A metilação do ADN envolve a adição de um grupo metil ($-\text{CH}_3$) na posição 5' dos resíduos de citosina (C), num contexto de dinucleótido citosina-guanina (CpG), originando a 5-metilcitosina (Figura 1).

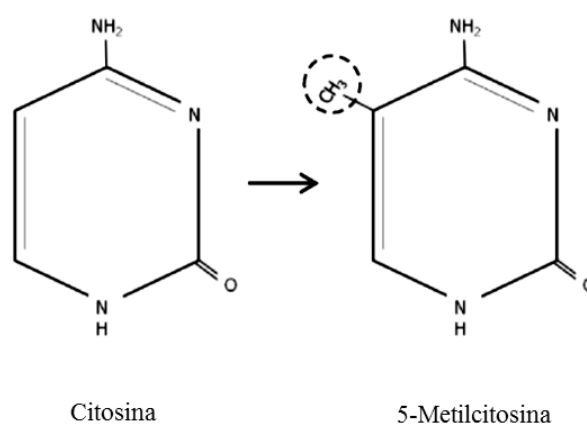


Figura 1 - Exemplo da metilação do ADN numa citosina. Adaptado de Vidaki et al. (2013).

Os dinucleótidos CpG são sequências citosina-fosfato-guanina que se agrupam em regiões genómicas designadas de ilhas CpG (CGI), localizadas em promotores de genes (Figura 2). Estas ilhas estão localizadas na região regulatória de genes humanos (posição 5') e possuem um comprimento de 300-3000 pares de bases (pb) e um conteúdo GC superior a 55 % (Vidaki, Daniel, and Court 2013; Hernando-Herraez et al. 2015). O genoma humano contém cerca de 30 milhões de locais CpG e cerca de 60-90 % destes estão metilados (Hernando-Herraez et al. 2015; Patterson et al. 2011). No entanto, a metilação do ADN também pode ocorrer fora do contexto CpG, tal como reportado em células estaminais (Ramsahoye et al. 2000).

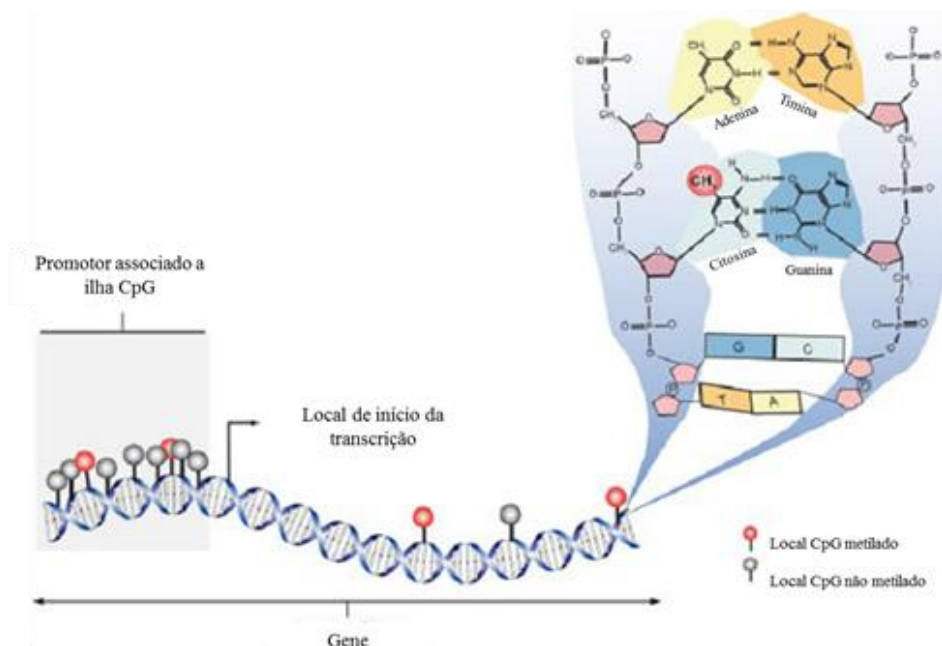


Figura 2 - Esquema da metilação de citosinas num contexto CpG. Adaptado de Patterson et al. (2011).

A metilação do ADN é catalisada pela atividade enzimática das ADN metiltransferases (DNMTs), que asseguram a sua manutenção após cada ciclo celular de replicação do ADN, bem como da metilação *de novo* para a criação dos padrões de metilação, no início do desenvolvimento (Fernandez, Huidobro, and Fraga 2012).

1.1.1.1. A metilação do ADN e a expressão genética

O papel deste mecanismo epigenético na regulação da expressão genética é amplamente conhecido pelo silenciamento da expressão de genes (Figura 3). A metilação está relacionada com a repressão transcripcional de regiões promotoras de genes, interferindo com a ligação de fatores de transcrição e conduzindo à inativação dos genes. Por outro lado, aquando da metilação do ADN, ocorre um recrutamento de proteínas ligantes que reconhecem a existência de ADN metilado. Consequentemente, as histonas deacetilases e os complexos de remodelação da cromatina reforçam a estabilidade da cromatina condensada (Mastroeni et al. 2011). Contudo, a metilação do ADN também foi associada a alguns casos de ativação de genes (Newell-Price, Clark, and King 2000).

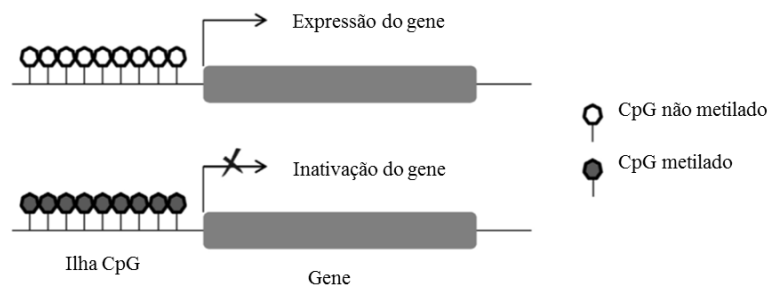


Figura 3 - Representação esquemática do mecanismo de regulação de genes. A inativação do gene apenas ocorre na presença da metilação na sua região promotora. Adaptado de Vidaki et al. (2013).

1.1.1.2. A metilação do ADN e a influência ambiental

Embora a metilação do ADN seja considerada uma modificação epigenética estável, esta é amplamente influenciada por vários fatores exógenos e endógenos (Kader and Ghai 2015). A metilação do ADN atua com uma interface entre o genoma e a dinâmica ambiental. Assim, a alteração dos padrões de metilação surge, em resposta a um *stress* ambiental fixo ou temporário, como um mecanismo de adaptação do genoma, permitindo expressar diferentes fenótipos (Szyf 2011).

Os gémeos monozigóticos constituem um sistema ideal para a investigação epigenética relativamente à interação entre os fatores ambientais e as marcas epigenéticas de longa duração no fenótipo, uma vez que partilham a mesma informação genética (Fraga et al. 2005; Czyz et al. 2012). Fraga et al. (2005) verificaram que gémeos jovens apresentaram quantidades similares de ADN metilado, enquanto que em gémeos mais velhos estes valores diferiram significativamente na quantidade e nos padrões de metilação. Desta forma, a interação de fatores que influenciam a metilação do ADN, ao longo do tempo de vida, pode explicar a variação das características antropomórficas e as diferenças na suscetibilidade a doenças (Fraga et al. 2005).

No sentido de averiguar a influência da nutrição nas alterações dos padrões do ADN metilado, vários componentes alimentares foram estudados e identificadas vias de alteração na expressão de genes (Park, Friso, and Choi 2012). Verificou-se ainda que a alimentação materna afeta epigeneticamente os fenótipos das gerações e pode aumentar a suscetibilidade a doenças (Tammen, Friso, and Choi 2013).

Os fatores de risco, como o tabaco, têm sido relacionados com padrões de metilação de ADN específicos, em tecidos tumorais. A exposição a químicos ou poluentes ambientais também induz alterações na metilação do ADN originando fenótipos associados a mutações (Kader and Ghai 2015).

Os fatores psicossociais, por exemplo a produção de cortisol numa condição de *stress* e o estado socioeconómico, encontram-se amplamente relacionados com este mecanismo epigenético, uma vez que os seus mecanismos de ação influenciam o estado de metilação de promotores de genes responsáveis pela patogénese de doenças mentais (Lam et al. 2012).

1.1.1.3. A aplicação da metilação do ADN nas Ciências Forenses

O ADN é um material biológico frequentemente usado na identificação pessoal, em Ciências Forenses. Para tal, a identificação de evidências num local de crime deve ser realizada de forma não destrutiva, preservando a amostra e o ADN para análises posteriores. Numa primeira etapa são realizados testes presuntivos e confirmatórios em fluídos biológicos mais comumente encontrados em cenas de crime, tais como sangue, saliva, sêmen e fluído vaginal. A determinação da identidade de origem do material biológico é fulcral na reconstrução da cena de crime.

A metilação do ADN é a componente mais acessível e melhor caracterizada das inúmeras marcas que constituem o epigenoma. Sendo esta uma modificação química extremamente estável, a determinação do estado de metilação de regiões do ADN específicas tem-se revelado como um biomarcador em diversas áreas forenses (Vidaki, Daniel, and Court 2013). A identificação de fluídos corporais baseados na metilação do ADN revelou ser um enorme potencial em Ciências Forenses, onde a deteção e identificação de material biológico presente em cenários de crime é crucial para a investigação forense (Kader and Ghai 2015).

Numa perspetiva forense, a análise de perfis de metilação fornece informações relevantes, como por exemplo, a verificação de amostras, identificação de fluídos biológicos/tecidos, determinação do género, estimativa da idade, estados patológicos, circunstâncias da morte, informações de ancestralidade e distinção de gémeos monozigóticos (Gunn, Walsh, and Roux 2014). A análise do estado de metilação do ADN tem demonstrado elevada sensibilidade e especificidade, recorrendo a métodos eficientes de extração e purificação de ácidos nucleicos (Gunn, Walsh, and Roux 2014; Choi et al. 2014).

1.1.1.3.1. Verificação da veracidade de amostras de ADN

Na maioria dos casos, assume-se que qualquer vestígio encontrado no local do crime tem uma origem biológica. No entanto, Fumkin et al. (2010) considerou fácil a fabricação de evidências de ADN para simular amostras do tipo forense, como por exemplo síntese artificial de sangue, saliva e pele. Isto pode ser preocupante, uma vez que as evidências referentes a material biológico

têm bastante valor em Tribunal. Desta forma, foram testados os perfis de metilação de ADN artificial e comparados com ADN humano. Este estudo revelou que o ADN sintetizado artificialmente é consistentemente não metilado em todos os *loci*, enquanto que o ADN biológico possui *loci* metilados e não metilados. Assim, usando a metilação diferencial, os investigadores forenses podem extrapolar a credibilidade de vestígios de ADN localizados na cena de crime (Frumkin et al. 2010).

1.1.1.3.2. Identificação de fluídos biológicos/tecidos

A par dos perfis de ADN, a informação relativa à origem celular de material biológico pode ser benéfica na reconstituição de acontecimentos que ocorreram na cena do crime, sendo que a presença de fluídos corporais específicos pode estar relacionada com particulares tipos de crimes (Vidaki, Daniel, and Court 2013). As manchas biológicas comumente encontradas são sangue, sémen, saliva, suor, fluído vaginal e células da epiderme.

Atualmente, os testes químicos e microscópicos usados na identificação de fluídos são presuntivos, com vários graus de sensibilidade e especificidade. Por exemplo, a deteção de sangue baseia-se na atividade catalítica da peroxidase do grupo heme da hemoglobina, realizado por testes de quimioluminescência do Luminol (BlueStar[®]Forensic) ou de fenolftaleína (teste Kastle-Meyer). Os métodos de deteção de saliva avaliam a atividade enzimática da amílase (α -amilase) usando *kits* comerciais para o teste Phadebas[®], no entanto esta enzima pode ser encontrada em urina, levando a resultados inconclusivos (Madi et al. 2012).

Uma vez que cada tipo de tecido é constituído por células com um transcriptoma único, é possível a identificação de fluídos corporais e de tecidos biológicos presentes num local do crime por análise do mARN. Em 2013, Hanson e Ballantyne identificaram tecidos e fluídos biológicos com recurso à deteção de 6 mARN de genes: IL19 (secreção vaginal), IL1F7 (pele), ALAS2 (sangue), MMP10 (sangue menstrual), HTN3 (saliva) e TGM4 (sémen) (Hanson and Ballantyne 2013). No entanto, os ensaios baseados em mARN estão dependentes da estabilidade deste ácido nucleico, pelo que este é muito instável devido à rápida degradação por ARNases. Assim, a identificação de tecidos/fluídos pode ser comprometida pela utilização ARN, possibilitando a introdução da análise de ADN metilado (Frumkin et al. 2011).

Lee et al. (2012) testaram uma nova metodologia para a identificação de material biológico com base em regiões diferencialmente metiladas de tecidos específicos (tDMRs). As regiões DACT1, USP49 e PRMT2 apresentaram perfis hipometilados para sémen e a região PFN3 na identificação de fluído vaginal (Lee et al. 2012). Madi et al. (2012) avaliaram a quantidade relativa

de citosinas metiladas de vários locais CpG. Dos *loci* estudados, o ZC3H12D revelou especificidade para sangue, FGF7 para sêmen e BCAS4 para saliva (Madi et al. 2012).

1.1.1.3.3. Determinação do gênero

Naito et al. (1993) introduziram a análise da metilação do ADN em investigações forenses. Estes utilizaram a análise dos perfis de metilação para a determinação do gênero. Neste estudo foram analisados os padrões de metilação de uma região específica do cromossoma X, DXZ4. Esta região apresentou baixos níveis de metilação no cromossoma X inativo, porém hipermetilada no cromossoma X ativo. Assim, como os indivíduos do sexo masculino possuem apenas um cromossoma X no estado ativo, não apresentam resultado para o cromossoma inativo presente em mulheres (Naito et al. 1993).

1.1.1.3.4. Marcadores informativos da ancestralidade de fluidos/tecidos e associação com doenças

Uma das aplicações da metilação do ADN nas Ciências Forenses é a determinação de características informativas de ancestralidade. Heyn et al. (2013) identificou diferenças na metilação de linhas celulares de linfoblastóides (LCLs) do sangue de 3 populações humanas, relacionando a metilação do ADN com variações fenotípicas, tais como a resposta a vários estímulos, frequência de doenças, percepção sensorial e aparências (Heyn et al. 2013).

O *locus HLA-DPA1* é fortemente correlacionado com a infecção crônica de hepatite B (HBV), sendo que as populações com maior prevalência desta infecção são a africana e asiática (Heyn et al. 2013). A repressão deste *locus* foi associada à sua metilação nestas populações, pela identificação do risco dos alelos estimularem a variação na apresentação de recetores na superfície da célula, alterando a ligação da HBV e, consequentemente aumento do risco de infecção (Heyn et al. 2013; Hernando-Herraez et al. 2015).

1.1.1.3.5. Discriminação de gémeos monozigóticos

Os estudos de metilação do ADN em gémeos monozigóticos permitiram identificar a relação entre a epigenética e a influência ambiental. Fraga et al. (2005) concluíram que os padrões de metilação eram mais divergentes em gémeos monozigóticos mais velhos. Nos casos em que estes cresceram em ambientes próximos e com estilos de vida comuns (dieta, hábitos tabágicos, consumo

de álcool e exposição a poluentes), as variações na metilação do ADN foram mínimas (Fraga et al. 2005; Kader and Ghai 2015).

Por outro lado, a identificação de gémeos monozigóticos, em casos forenses, tem-se revelado um desafio. Teoricamente, estes possuem a mesma sequência de ADN genómico e, consequentemente a tipagem convencional de ADN não os diferencia. Se uma evidência for encontrada num local de crime, os investigadores poderão ter dificuldades em identificar qual o gémeo perpetrador. Os dados estatísticos apontam para que 1 em 300 indivíduos seja gémeo monozigótico, o que torna imperativo uma metodologia que os distinga (Kader and Ghai 2015). Uma vez que os fenótipos de gémeos monozigóticos apresentam diferenças resultantes de alterações no estado de metilação do ADN, torna-se importante identificar marcadores que os permitam distinguir. Stewart et al. (2015) estudaram as alterações nos perfis de metilação de dois marcadores (*Alu-E2F3* e *Alu-SP*), em gémeos, e constaram que com o envelhecimento ocorrem alterações significativas na metilação nestes *amplicons*, resultando na diferenciação destes indivíduos (Stewart et al. 2015).

1.1.1.3.6. Determinação da origem parental dos alelos

Em testes de paternidade, o presumível pai é excluído quando este não possui o gene obrigatório, o qual pode ser determinado a partir do genótipo do indivíduo (presumível filho), quando o material genético materno é conhecido. No caso da ausência da mãe, o gene obrigatório não pode ser determinado resultando numa probabilidade de exclusão reduzida. Assim, a determinação da origem parental dos alelos sem recurso a análise genealógica pode ser uma solução (Vidaki, Daniel, and Court 2013). Cada indivíduo possui duas cópias (alelos) de cada gene autossómico, um materno e o outro paterno. A marca epigenética no gene de origem parental é designada por *imprinting* genómico. Os alelos materno e paterno são diferencialmente metilados e, portanto, a origem parental pode ser determinada pela análise do estado de metilação de cada um dos alelos (Reik and Walter 2001).

1.1.1.3.7. Determinação da causa e circunstâncias da morte

A função principal de um patologista forense inclui a investigação da causa da morte, especialmente em mortes repentinas ou não testemunhadas. O principal propósito do uso da bioquímica *post-mortem* e da biologia molecular é a examinação das alterações fisiopatológicas envolvidas na morte. Uma vez que existem alterações nos níveis de metilação do ADN em doenças, é interessante estudar o estado do ADN metilado para averiguar a possível causa de morte

(Vidaki, Daniel, and Court 2013). A exposição de indivíduos a elevadas concentrações de chumbo permitiu verificar a ocorrência da hipermetilação da região promotora do gene *P16*, em casos de envenenamento com este composto. Por outro lado, as doenças causadas por estilos de vida ou mortes cardíacas podem estar relacionados com genes do relógio circadiano (*Per1*, *Per2*, *Per3*, *Cry1*, *Cry2*, *Bmal1*, *Tim* e *Ckle*). Estes genes desempenham um papel essencial na formação do relógio biológico, porém podem apresentar perfis de metilação aberrantes, em consequência de doenças, por exemplo cardíacas (Nakatome et al. 2011).

1.2. O Envelhecimento

Ao longo da vida, um processo estocástico conduz a alterações graduais ao nível celular e molecular - o envelhecimento. Este é um processo complexo e que representa a progressão de múltiplos processos degenerativos nos indivíduos (Bell et al. 2012). As suas taxas são influenciadas pela hereditariedade, fatores ambientais, estilos de vida e doenças (Xu et al. 2015). A avaliação do envelhecimento pode ser utilizada para prever, monitorizar e fornecer dados relativos ao declínio fisiológico associado à idade e doenças (Hannum et al. 2013).

Vários estudos têm identificado fatores que contribuem para diferentes tempos de vida e taxas de envelhecimento saudável dos indivíduos, entre os quais se incluem componentes de mecanismos biológicos envolvidos na senescência celular, *stress* oxidativo, reparação do ADN e glicação proteica (Vijg and Campisi 2008). Desta forma, as alterações ao nível morfológico, bioquímico e molecular são consideradas biomarcadores do envelhecimento permitindo a estimativa da idade (Meissner and Ritz-Timme 2010).

1.2.1. A idade

A idade dos indivíduos pode ser classificada por dois critérios distintos: a idade biológica e cronológica. A idade cronológica é uma característica extrínseca baseada em unidades de tempo e que reflete a premissa de que todas as pessoas envelhecem a um ritmo constante. Por outro lado, dado que as taxas de envelhecimento não são fixas nas populações, a idade biológica surge como um conceito intrínseco a cada indivíduo (Aviv 2002). Atualmente, este tem sido proposto como o melhor preditivo do tempo de vida e da capacidade funcional comparativamente à idade cronológica (Hannum et al. 2013).

A avaliação do envelhecimento pode auxiliar, por exemplo em investigações forenses, na estimativa da idade do perpetrador de um crime ou na identificação de vítimas, onde a informação relativa à idade pode ser fundamental (Meissner and Ritz-Timme 2010; Xu et al. 2015).

1.2.1.1. A importância da determinação da idade

A idade dos indivíduos é uma importante característica fenotípica em Ciências Forenses (Ou et al. 2012). Os recentes avanços na análise forense de ADN têm permitido obter perfis genéticos de indivíduos, a partir de evidências biológicas encontradas nas cenas de crime. Assim, os perfis encontrados podem ser comparados com os perfis recolhidos das amostras das vítimas ou dos suspeitos ou ainda, com todos os perfis presentes em bases de dados. No entanto, existem casos onde o indivíduo não é identificado por estes perfis e procede-se à avaliação das suas características fenotípicas, como o género e a idade (Saeed, Berlin, and Cruz 2012; Kader and Ghai 2015; Xu et al. 2015).

Nas últimas décadas, a procura de técnicas de elevada precisão da estimativa da idade aumentou consideravelmente devido a questões sociopolíticas. Atualmente, a investigação da idade possui uma elevada importância devido ao aumento do número de refugiados e pedidos de asilo, tráfico humano e pornografia infantil, numa tentativa de impedir a adulteração da idade (Borrman, Cattaneo, and Collins 2000; Franklin and Noble 2015). Portanto, a estimativa da idade tornou-se crucial na identificação indivíduos vivos, sem documentos válidos, que possam ser requeridos em situações relativas a imputabilidade de jovens ou pedidos de pensão de idosos (Franklin and Noble 2015). Uma correta identificação é fulcral no que concerne a razões administrativas e éticas, uma vez que acarreta consequências legais. No Direito Civil, a morte de uma pessoa altera o estado civil e jurídico, não apenas do falecido, mas também dos familiares. Além das questões civis e penais, o falecimento de um indivíduo possui ramificações económicas e financeiras decorrentes de questões relativas a heranças e seguros. Em processos de identificação indivíduos, a idade é um fator de relevo aquando da realização de processos de triagem em base de dados de desaparecidos, sendo uma solicitação pedida pelas autoridades judiciais (Borrman, Cattaneo, and Collins 2000).

1.2.1.2. Biomarcadores de determinação da idade

A estimativa da idade de um indivíduo surge como uma importante questão, nas investigações forenses e, para tal várias metodologias têm sido descritas. Os patologistas e os antropólogos podem estimar a idade de um indivíduo pela examinação dos registos dentários e

pelas medições dos restos esqueléticos (Lynnerup et al. 2010). Porém, estes métodos morfológicos apenas são úteis em casos onde o indivíduo ou o seu corpo está presente. No entanto, na maioria dos casos, o perpetrador fugiu após ter consumado o crime, deixando apenas evidências biológicas, tais como sangue, saliva, sêmen e/ou células epiteliais. A partir destes materiais biológicos, a idade biológica pode ser determinada por biomarcadores bioquímicos e/ou moleculares (Saeed, Berlin, and Cruz 2012; Meissner and Ritz-Timme 2010; Kader and Ghai 2015; Xu et al. 2015).

1.2.1.2.1. Biomarcadores baseados em alterações proteicas

1.2.1.2.1.1. Racemização aminoacídica – racemização do ácido aspártico

Na síntese proteica, exclusivamente em mamíferos, as proteínas são produzidas utilizando apenas os aminoácidos-L. Com o envelhecimento, a instabilidade química dos resíduos de ácido aspártico e asparagina pode originar modificações proteicas espontâneas após a sua síntese e pode ser detetada pelo aumento do conteúdo de ácido aspártico-D. A formação deste enantiômero é o resultado do processo de racemização do ácido aspártico bem como do aminoácido asparagina. Desta forma, a quantificação da racemização do ácido aspártico pode auxiliar a estimativa da idade, em termos bioquímicos (Meissner and Ritz-Timme 2010). Atualmente, esta é a melhor metodologia na previsão da idade a partir de tecidos dentários (dentina) e de proteínas purificadas (osteocalcina e elastina), uma vez que permite estimar a idade com elevada precisão: 1,5-4 anos (Borrman, Cattaneo, and Collins 2000; Ritz-Timme, Laumeier, and Collins 2003). A excelente precisão deve-se à correta standardização dos protocolos e das excelentes curvas de calibração obtidas para cada tecido/proteína. No entanto, este método de determinação da idade apresenta imprecisão relativa a indivíduos idosos e carece da extração de tecidos de forma invasiva pela remoção de dentes, o que poderá impedir o uso deste biomarcador em indivíduos vivos (Meissner and Ritz-Timme 2010).

1.2.1.2.1.2. Acumulação de produtos finais de glicação avançada (AGEs)

Os produtos finais de glicação avançada (AGEs) constituem um grupo complexo e heterogêneo de compostos formados pela redução de açúcares e de outros componentes α -carbonílicos, através de reações oxidativas e não-oxidativas com grupos aminoacídicos (Pilin, Pudil, and Bencko 2007; Vlassara and Uribarri 2014). Os AGEs acumulam-se nas proteínas com tempos de vida mais longos, como por exemplo o colagénio, durante o processo de

envelhecimento. Assim, a quantificação destes produtos funciona como um relógio bioquímico em diversos tecidos e, adicionalmente como um biomarcador da idade (Pilin, Pudil, and Bencko 2007).

Existem diversas variáveis que podem influenciar a quantidade de AGEs ao longo do envelhecimento, por exemplo os portadores de Diabetes *mellitus* possuem uma acelerada acumulação destes e, conseqüentemente introduzem erros na estimativa da idade (Vlassara and Uribarri 2014).

1.2.1.2.2. Biomarcadores baseados em alterações moleculares

1.2.1.2.2.1. Deleção mitocondrial – quantificação da deleção 4977 pb

A mitocôndria é um organelo semiautônomo que realiza a sua própria de síntese de proteínas, bem como da replicação da dupla cadeia de ADN (Meissner and Ritz-Timme 2010). A componente mitocondrial é constituída por cinco complexos enzimáticos essenciais na respiração e fosforilação oxidativa, onde a glucose e os lípidos são oxidados para gerar ATP. Durante este processo, 0,2 % do O₂ consumido é libertado sob a forma de radicais livres, como superóxido e o radical peridroxil e peróxido de hidrogénio (St-Pierre et al. 2002). Estas espécies reativas de O₂ podem danificar lípidos, proteínas e ADN, sobretudo o mitocondrial, uma vez que este se encontra localizado nas proximidades da cadeia transportadora de eletrões.

Os danos oxidativos desempenham um papel substancial na mutagénese mitocondrial e podem levar a deleções (Zapico and Ubelaker 2015). Estas são consideradas eventos estocásticos e aumentam ao longo do envelhecimento num fator de 10⁴, apresentando especificidade de padrões de deleção para diferentes tecidos (Meissner and Ritz-Timme 2010).

Dos vários rearranjos resultantes das deleções do ADNmt, a deleção de 4977 pb foi a mais estudada em diversos tecidos humanos, por diferentes métodos baseados na técnica de PCR, tendo sido considerada como uma candidata à estimativa da idade. Atualmente, este método apenas consegue diferenciar jovens de idosos, já que a sua margem de erro é de 40 anos (Meissner and Ritz-Timme 2010). Adicionalmente, este biomarcador da idade apresenta alguns problemas, um dos quais se relaciona com os níveis de *stress* oxidativo, os quais podem originar o aumento de radicais livres e, conseqüentemente erros na previsão da idade. Por outro lado, as técnicas utilizadas na quantificação desta deleção podem estar na origem das dificuldades na correta quantificação desta deleção mitocondrial, sendo essencial uma correta otimização (Zapico and Ubelaker 2015).

1.2.1.2.2.2. Telómeros – determinação do comprimento dos telómeros

Localizados nas extremidades dos cromossomas, os telómeros são constituídos por cerca de 15 a 20 mil pb repetidas em sequência tandem (TTAGGG/CCCTAA)_n e estão associados a proteínas esterinas. Esta ligação telómero-proteína é requerida para a estrutura do telómero. O *capping* das extremidades dos cromossomas permite a proteção dos telómeros e é fulcral na manutenção da estabilidade cromossomal e na prevenção da interrupção do ciclo celular (Aubert and Lansdorp 2008).

Durante a replicação dos cromossomas, a polimerase do ADN não replica o final da cadeia *lagging*, causando o encurtamento da sequência do telómero ao longo do tempo, podendo levar à senescência ou morte celular. Numa tentativa de reverter esta situação, a enzima transcriptase reversa alonga os telómeros pela adição de unidades de repetição no final das cadeias (Jiang, Ju, and Rudolph 2007; Aubert and Lansdorp 2008).

Ao longo do envelhecimento, foi observado que a média do comprimento do fragmento de restrição terminal dos telómeros (TRF) diminuía 20-60 pb por ano. Desta forma, a determinação da diminuição dos telómeros pode auxiliar na estimativa da idade. No entanto, a qualidade do material biológico pode ter influência na estimativa, visto que com ADN degradado, o comprimento dos TRFs era menor cerca de 500 pb, comparativamente a material biológico fresco. Por outro lado, a média do comprimento é hereditária e variável entre indivíduos, sendo afetada por doenças crónicas (Gutierrez-Rodrigues et al. 2014).

1.2.1.2.2.3. Rearranjos de genes somáticos – quantificação de sjTRECS

As células T, produzidas no timo, desempenham um papel essencial no sistema imunitário. Quando as células são invadidas por antigénios desconhecidos, tais como bactérias, vírus ou parasitas, os segmentos de ADN presentes nos genes dos recetores das células T (TCR) são eliminados e formam-se moléculas de ADN circular, *signal joint TCR excision circles* (sjTRECs) (Zubakov et al. 2010; Kayser and de Knijff 2011). Estes produtos resultantes do rearranjo de genes somáticos diminuem no sangue humano com o aumento da idade. Através da quantificação de sjTRECs, Zubakov et al. (2010) conseguiu estimar a idade com um erro de 9 anos (Zubakov et al. 2010). Para o sucesso deste biomarcador, a qualidade do material biológico é essencial, já que no estudo referido, este não revelou ser um método robusto em amostras degradadas e com reduzidas concentrações de ADN (5 ng) (Ou et al. 2012).

1.2.1.2.2.4. Biomarcadores de ARN

A avaliação das taxas de degradação de ARN em material biológico permitiu identificar uma nova metodologia para a estimativa da idade (Jarman et al. 2015). Os microARN (miARNs) regulam a tradução de um ou mais ARNs mensageiros (mARNs) em proteínas, pela sua ligação à região 3' não-traduzida dos mARNs, originando uma falha na tradução (Noren Hooten et al. 2013). Vários miARNs têm níveis dependentes da idade, sendo que, particularmente os miARNs circulatórios se apresentam como biomarcadores da idade, de doenças e de estados fisiológicos, podendo ser encontrados na linfa ou no sangue (Overhoff et al. 2014).

Por outro lado, os níveis de regulação da expressão de genes associados à idade foram identificados ao nível do mARN e alguns destes podem ser usados para o desenvolvimento de biomarcadores moleculares da idade (Noren Hooten et al. 2013).

O ARN é um ácido nucleico menos estável comparativamente ao ADN. Desta forma, os métodos moleculares de estimativa da idade por ARN podem não ser aplicáveis em amostras antigas, sendo essencial novos métodos de preservação do ARN em materiais biológicos (Jarman et al. 2015).

1.2.1.2.3. A Epigenética e a estimativa da idade

A estimativa precisa da idade não é uma tarefa fácil de concretizar, uma vez que o envelhecimento é um processo extensivamente complexo. Este é regulado pelo desenvolvimento e controlado por modificações epigenéticas específicas (Yi et al. 2015). Contudo, a investigação relativa às alterações dos padrões epigenéticos relacionados com a idade apresenta-se como desafio promissor no estudo do envelhecimento humano (Vidaki, Daniel, and Court 2013).

Das várias modificações epigenéticas estudadas, a metilação do ADN tem sido amplamente relacionada com o envelhecimento, visto que a quantidade global de ADN metilado diminui com o envelhecimento em tecidos humanos, como consequência da progressiva perda de eficiência da DNMT1a (Fuke et al. 2004); enquanto que alguns *loci* associados a genes específicos tornam-se hipermetilados durante o envelhecimento (Almén et al. 2014; Yi et al. 2014). Assim, as alterações na metilação do ADN associadas à idade não se baseiam na deteriorização aleatória e podem-se revelar excelentes indicadores biológicos da idade (Yi et al. 2015).

Um dos primeiros estudos realizados para a determinação da idade por análise da metilação do ADN foi realizado por Bocklandt et al. (2011). Estes descreveram um método de estimativa da idade, através da análise da metilação do genoma de amostras de saliva de 34 pares de gémeos monozigóticos, identificando 88 *loci* correlacionados com a idade. No entanto, apenas três

promotores de genes (EDARADD, NPTX2 e TOM1L1) foram analisados por um modelo de regressão que conseguia estimar a idade dos indivíduos com uma precisão de 5,2 anos. Contudo, verificaram que os padrões de metilação dos promotores dos genes EDARADD e TOM1L1 diminuíram com o envelhecimento, ao invés do marcador NPTX2 que apresentou um progressivo aumento. É de salientar que este estudo permitiu identificar uma associação entre a metilação do ADN e doenças associadas ao envelhecimento. As alterações no estado de metilação do gene EDARADD podem reduzir a capacidade de cicatrização dos tecidos, resultando na perda de glândulas sudoríparas, cabelo e dentes. Em casos de cancro pancreático, a metilação do NPTX2 encontra-se regulada positivamente, por outro lado a sua expressão é aumentada em portadores da doença de Parkinson (Bocklandt, Lin, and Sehl 2011).

A maioria das alterações na metilação do ADN associadas à idade é específica de tecidos. Koch and Wagner (2011) analisaram dados presentes em repositórios de 13 tipos de células e tecidos, tendo identificado 431 locais CpG hipermetilados e 25 locais CpG hipometilados associados ao envelhecimento. Deste amplo grupo, selecionaram 5 locais CpG (TRIM58, KCNQ1DN, NPTX2, BIRC4BP e GRIA2) para integrarem um modelo de assinatura epigenética associada à idade, cuja precisão foi de 9,3 anos (Koch and Wagner 2011). Mais recentemente, Horvath et al. (2013) desenvolveu uma metodologia de estimativa da idade por análise do estado de metilação de 353 locais CpG de diferentes tipos de células e tecidos com uma precisão de 3,6 anos (Horvath 2013).

A identificação de padrões de metilação em *loci* associados ao envelhecimento tornou-se alvo que vários estudos. Na Tabela 1, estão descritos vários genes cujos promotores foram recentemente relacionados com o envelhecimento, com o objetivo de previsão da idade humana.

Tabela 1 - *Locus* identificados como biomarcadores da idade, em populações humanas, por alterações nos padrões de metilação do ADN nos seus promotores durante o envelhecimento.

| Gene | Posição | Função | Material Biológico | Referência |
|----------------|--------------------------|---|--------------------|--|
| ADAR | chr1:154582062-154608206 | <i>RNA editing</i> | Sangue | Xu et al. 2015 |
| AQP11 | chr11:77589635-77610355 | Transporte celular | Sangue | Xu et al. 2015 |
| ASPA | chr17:3476002-3503419 | Deacetilação do ácido N-acetilaspártico | Sangue, Saliva | Bram Bekaert et al. 2014; B. Bekaert et al. 2015; Huang et al. 2015; Weidner et al. 2014 |
| EDARADD | chr1:236394278-236482692 | Codifica uma proteína adaptadora em sinalização celular | Sangue, Saliva | Bocklandt, Lin, and Sehl 2011; Bram Bekaert et al. 2014; B. Bekaert et al. 2015; Weidner et al. 2014 |
| ELOVL2 | chr6:10980759-11044314 | Elonga a cadeia longa de ácidos gordos | Sangue, Saliva | Bram Bekaert et al. 2014; B. Bekaert et al. 2015; Hannum et al. 2013; Steegenga et al. 2014; Zbieć-Piekarska et al. 2015 |
| FHL2 | chr2:105360826-105438503 | Assegura a ligação de vias de sinalização à regulação da transcrição | Sangue | Hannum et al. 2013; Steegenga et al. 2014; Zbieć-Piekarska et al. 2015 |
| ITGA2B | chr17:44372183-44389505 | Adesão celular | Sangue | Bram Bekaert et al. 2014; Huang et al. 2015; Weidner et al. 2014; Xu et al. 2015 |
| KLF14 | chr7:130731235-130734061 | Codifica um fator de transcrição que atua como co-repressor na via de sinalização TGF | Sangue | Hannum et al. 2013; Steegenga et al. 2014; Zbieć-Piekarska et al. 2015 |
| NPTX2 | chr7:98617297-98629868 | Modificação de propriedades celulares | Sangue, Saliva | Bocklandt, Lin, and Sehl 2011; Huang et al. 2015 |
| PDE4C | chr19:18207961-18255419 | Regulação de respostas celulares a sinais extracelulares | Sangue, Saliva | Bram Bekaert et al. 2014; B. Bekaert et al. 2015; Weidner et al. 2014; Xu et al. 2015 |
| PENK | chr8:56441272-56446734 | Modelação da perceção da dor e resposta ao <i>stress</i> | Sangue | Steegenga et al. 2014 |
| RAB36 | chr22:23145326-23164350 | Transporte proteico e tráfico vesicular | Sangue | Weidner et al. 2014 |
| TOM1L1 | chr17:54900513-54961956 | Codifica uma proteína envolvida em vias de sinalização | Sangue, Saliva | Bocklandt, Lin, and Sehl 2011; Huang et al. 2015 |
| TRIM59 | chr3:160435503-160449829 | Regulador multifuncional para vias de sinalização da imunidade inata | Sangue | Hannum et al. 2013; Zbieć-Piekarska et al. 2015 |

1.2.1.3. Métodos de estimativa da idade com base no ADN metilado

A par dos desenvolvimentos na Epigenética, têm surgido novos métodos para a determinação do estado de metilação de ADN de amostras, com o intuito de estimar a idade. Contudo, a escolha do melhor método para auxiliar nesta questão biológica pode tornar-se uma difícil tarefa (Kurdyukov and Bullock 2016). Existem fatores-chave que devem ser considerados aquando da escolha da metodologia para análise do ADN metilado:

- O objetivo do estudo (pretende-se analisar a metilação global do ADN ou apenas de um gene específico);
- A quantidade e qualidade das amostras de ADN;
- A sensibilidade e especificidade requerida no estudo;
- A robustez e simplicidade do método;
- A disponibilidade de *software* bioinformático para a análise e interpretação dos resultados;
- A disponibilidade de equipamentos especializados e reagentes;
- Os custos associados ao estudo.

O método de análise da metilação adequado para uma determinada questão biológica deve ser escolhido de acordo com o objetivo do estudo. A análise do ADN metilado pode ser efetuado para o genoma completo, regiões específicas ou genes (Shen and Waterland 2007). Na Figura 4, estão descritos os vários métodos disponíveis para cada tipo de estudo de metilação.

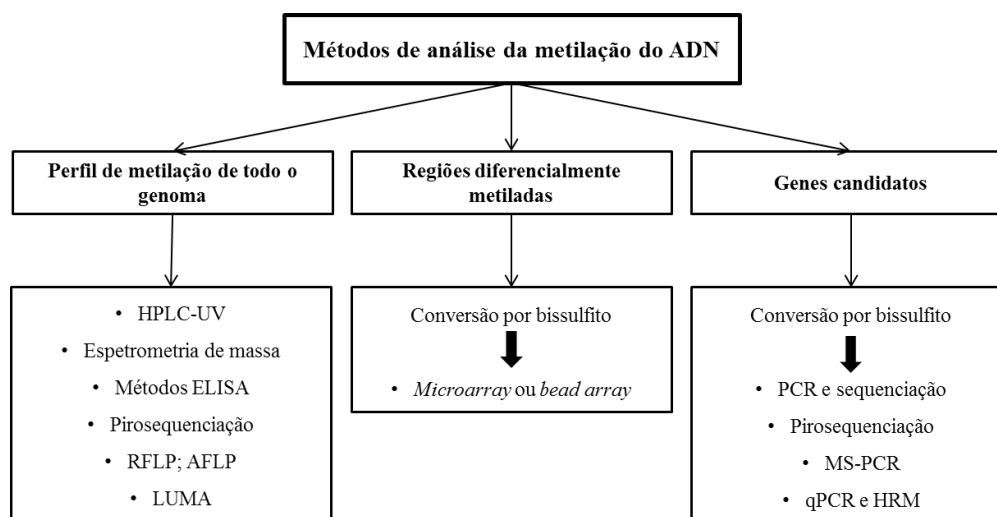


Figura 4 – Representação esquemática das várias técnicas de análise da metilação do ADN. Adaptado de Kurdyukov et al. (2016). **HPLC-UV** – *High-performance liquid chromatography*; **ELISA** – *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*; **RFLP** – *Restriction Fragment Length Polymorphism*; **AFLP** – *Amplified Fragment Length Polymorphism*; **LUMA** – *Luminometric Methylation Assay*; **MS-PCR** – *Methylation-specific PCR*; **HRM** – *High Resolution Melting*.

A avaliação da composição de metilação no genoma completo permite estudar eventos que interferem com a metilação do ADN, como o tratamento de células com determinados químicos, alterações celulares e mudanças epigenéticas que contribuem para a génese de tumores (Kurdyukov and Bullock 2016). Na avaliação do envelhecimento, esta análise pode ser realizada com o intuito de verificar a diminuição da metilação global ao longo do tempo de vida (Fuke et al. 2004), através de ensaios ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*). Este método permite a captura da amostra de ADN, através da qual as citosinas metiladas são detetadas por etapas sequenciais de incubação com um anticorpo primário para a 5-metilcitosina, seguido de um anticorpo secundário e, por fim, os reagentes de deteção colorimétricos (Kurdyukov and Bullock 2016).

Por outro lado, a análise do estado de metilação pode ser realizada em locais específicos, tais como as regiões diferencialmente metiladas ou genes. Por exemplo, no caso da determinação da idade, pretende-se analisar os padrões de metilação de promotores de genes relacionados com o envelhecimento (Bocklandt, Lin, and Sehl 2011). As técnicas disponíveis para este tipo de estudos possuem maior precisão, sensibilidade e eficiência, porém carecem de uma etapa precedente para a preservação do estado de metilação das amostras – a conversão do ADN (Tollefsbol 2004).

1.2.1.3.1. Conversão do ADN pelo método de bissulfito

A investigação de alterações no estado de metilação do ADN é amplamente realizada por protocolos baseados na técnica de PCR (Wojdacz and Hansen 2006). Devido às marcas de metilação serem removidas do ADN pela polimerase, estas não são replicadas durante a amplificação. Desta forma, o ADN extraído tem de ser modificado quimicamente com a utilização de bissulfito de sódio, a fim de preservar o estado de metilação (Wojdacz, Dobrovic, and Hansen 2008).

A conversão do ADN pelo método de bissulfito é comumente utilizada para a análise da metilação do ADN, facilitando a identificação e quantificação da metilação do ADN, numa elevada resolução. Este procedimento é constituído por três etapas (Figura 5): depois da desnaturação da dupla cadeia de ADN, ocorre a sulfonação da citosina pela adição de bissulfito, seguindo-se a desaminação hidrolítica que origina um uracilo sulfonado. Através de um tratamento alcalino, o grupo sulfonado é removido originando um uracilo. Este método apenas converte as citosinas não metiladas em uracilos, já que as citosinas metiladas são refratárias à desaminação mediada por bissulfito. Durante a amplificação por PCR, o uracilo é amplificado como timina, enquanto que a citosina metilada permanece citosina, permitindo assim avaliar o estado de metilação pela presença de citosinas *versus* timinas (Patterson et al. 2011).

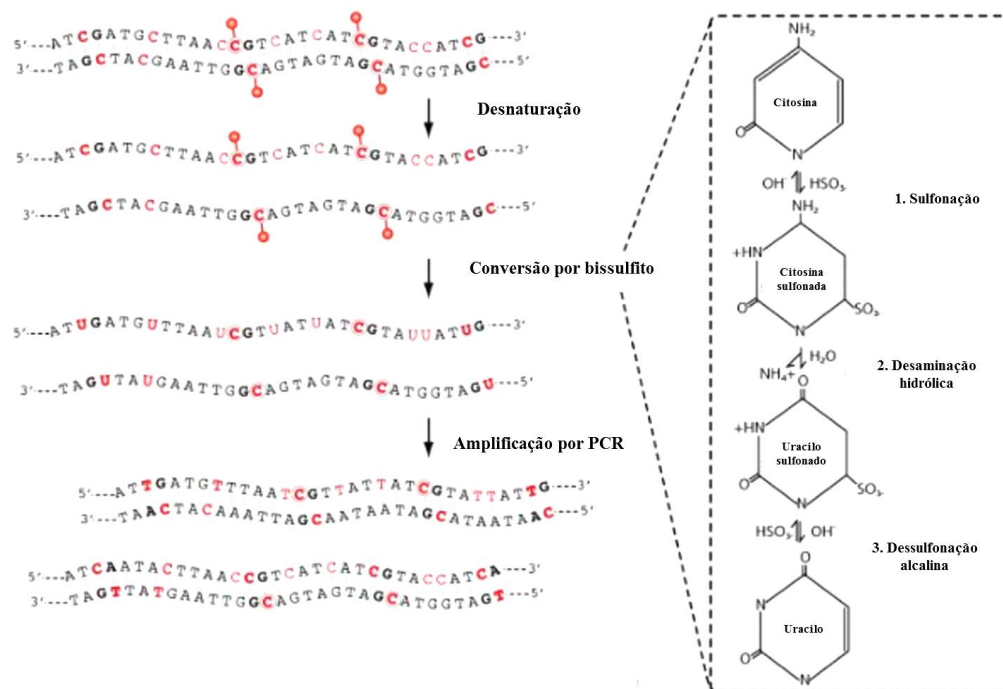


Figura 5 - Síntese esquemática da conversão química pelo método de bissulfito. A análise da metilação do ADN inclui quatro etapas principais: desnaturação, conversão por bissulfito, amplificação por PCR e análise dos resultados. À direita, estão descritas as modificações na molécula de citosina. Adaptado de Patterson et al. (2011).

1.2.1.3.1.1. PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

Em 1984, com o intuito de suprimir as limitações de sensibilidade inerentes aos protocolos existentes de detecção de ADN, Kary Mullis desenvolveu a técnica de reação em cadeia de polimerase (PCR) (Mullis et al. 2000). Esta baseia-se na amplificação exponencial de um segmento de ADN específico, envolvendo três fases: a desnaturação da dupla cadeia de ADN, o *annealing* dos *primers* e a extensão das cadeias (Figura 6). Inicialmente, ocorre a quebra da dupla cadeia de ADN por desnaturação térmica ($T > 90\text{ }^{\circ}\text{C}$). Em seguida, a baixas temperaturas ($50\text{ }^{\circ}\text{C} < T < 60\text{ }^{\circ}\text{C}$) o par de *primers* (*forward* e *reverse*) adicionado à reação liga-se à sequência complementar, delimitando o fragmento de ADN específico. Por último, ocorre a extensão da polimerase de ADN à temperatura de máxima atividade ($72\text{ }^{\circ}\text{C} < T < 78\text{ }^{\circ}\text{C}$). Esta enzima sintetiza a cadeia complementar utilizando nucleótidos trifosfatados (dNTPs) presentes na reação, na direção 5'-3'. No final de cada ciclo de PCR obtêm-se duas novas cadeias de ADN que servem de molde para o próximo ciclo. O resultado da PCR é o aumento exponencial do número total de fragmentos

específicos e cuja abundância é representada por um crescimento exponencial 2^n , onde n representa o número de ciclos (Joshi and Deshpande 2010).

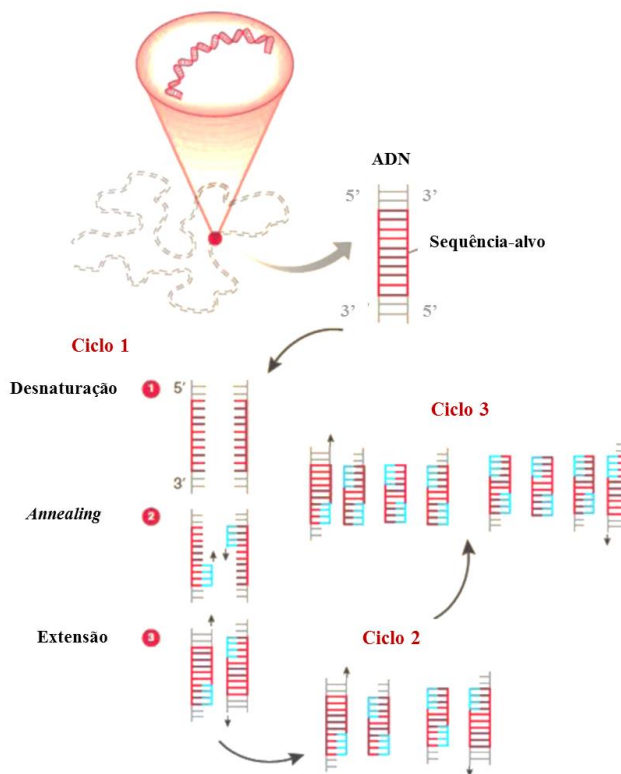


Figura 6 - Representação esquemática do princípio da PCR e das suas etapas. Adaptado de Carriço et al. (2013).

O sucesso da PCR está dependente dos parâmetros definidos para cada etapa e o respetivo número de ciclos, bem como dos componentes da reação: a amostra de ADN extraída e purificada, os *primers* da reação, a enzima *Taq* polimerase, os desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs), $MgCl_2$, KCl e o tampão da reação (Joshi and Deshpande 2010).

Para a estimativa da idade, os estudos baseados na análise dos padrões de metilação dos promotores de genes, descritos na Tabela 1, são realizados recorrendo à técnica de PCR. Após a amplificação, os fragmentos obtidos podem ser sequenciados ou pirosequenciados permitindo a análise do estado de metilação e, posteriormente a estimativa da idade (Shen and Waterland 2007).

1.2.1.3.1.1.1. Sequenciação

A sequenciação do ADN genómico modificado por bissulfito é frequentemente utilizada para a deteção de ADN metilado, uma vez que fornece uma abordagem qualitativa, quantitativa e eficiente na identificação de 5-metilcitosinas, com a resolução de um par de nucleótidos (Tollefsbol 2004). Este método, introduzido por Frommer et al. (1992), baseia-se no facto de que após o tratamento com bissulfito de sódio, as citosinas não metiladas, presentes na dupla-cadeia de ADN, são convertidas em resíduos de uracilo e reconhecidas como timinas após a amplificação. As 5-mCs são imunes à conversão e permanecem como citosinas, permitindo serem distinguidas (Frommer et al. 1992). Para a posterior análise por sequenciação, a técnica PCR é necessária para amplificar o fragmento do *locus* de interesse pelo uso de *primers* específicos para a metilação.

O estado de metilação dos promotores de genes pode ser determinado através da sequenciação ou clonagem dos produtos da PCR (Kurdyukov and Bullock 2016). O estado de metilação pode ser interpretado pela comparação dos resultados da sequenciação com a sequência de ADN inicial. Como as citosinas não metiladas são convertidas em timinas, a presença de um pico de citosina indica a presença de 5-mC no genoma, contudo a presença de dois picos de citosina e timina sugere a metilação parcial (Figura 7) (Tollefsbol 2004).

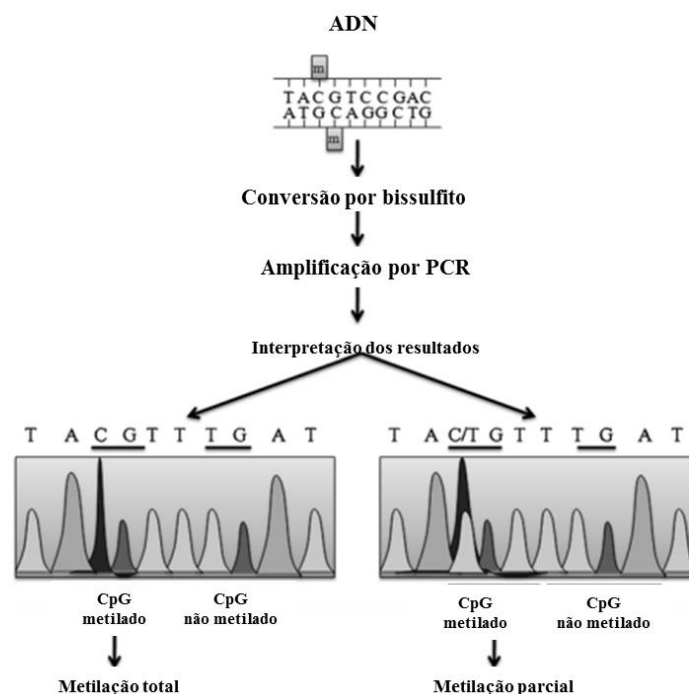


Figura 7 - Representação esquemática de exemplos de resultados a obter por sequenciação: a metilação total (à esquerda) ou parcial (à direita). Adaptado de Tollefsbol (2004).

1.2.1.3.1.1.2. Pirosequenciação

A pirosequenciação é uma técnica adequada a estudos que possuam inúmeras dificuldades na análise dos padrões metilação de ADN. Esta é baseada na libertação de pirofosfato (PPi) quando os nucleótidos são incorporados na sequência *primer*, caso esta seja complementar à sequência de ADN (Figura 8). Na presença de adenosina fosfossulfato (APS), a ATP sulfurilase utiliza PPi para produzir ATP. Por sua vez, o ATP conduz à conversão de luciferina em oxiluciferina, pela atividade da luciferase. A intensidade da luz produzida nesta reação é detetada pelo pirosequenciador e é dependente da quantidade de nucleótidos incorporados, em sequências específicas que rodeiam os locais CpG, sendo traduzida num pico. A partir desta informação, a percentagem de metilação pode ser calculada. Os resultados são quantitativos, pelo que podem ser detetadas pequenas diferenças nos padrões de metilação (abaixo de 5 %). No entanto, a pirosequenciação requer equipamento e técnicos especializados, acarretando custos (Delaney and Arbor 2015).

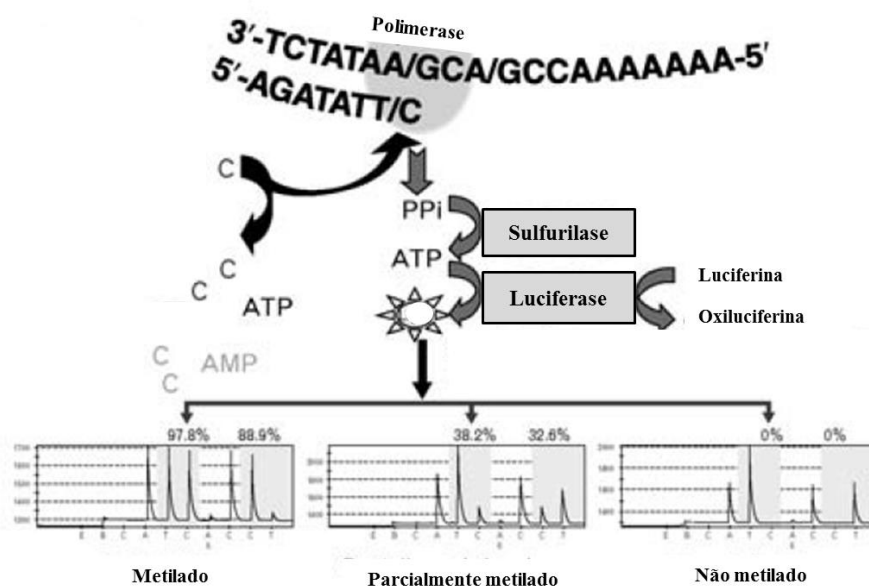


Figura 8 - Esquema representativo da análise de resultados da pirosequenciação. A luz gerada pela atividade da luciferase é convertida num sinal, que posteriormente é utilizado para a análise das quantidades de citosinas e timinas presentes. A altura dos picos é proporcional ao número de alelos metilados em cada local CpG. Adaptado de Shen et al. (2007).

1.2.1.3.1.1.3. PCR em Tempo Real (qPCR)

Com o intuito de monitorizar amplificação, Higuchi et al. (1993) desenvolveram a técnica de PCR em Tempo Real, também designada de PCR quantitativa (qPCR, qrt-PCR) (Higuchi, Fockler, and Dollinger 1993). Esta técnica baseia-se na amplificação por PCR convencional, no entanto esta fornece mais informação, dado que permite a deteção e quantificação de um produto de PCR em tempo real, durante a sua síntese. A deteção dos produtos amplificados é realizada através da emissão de fluorescência de fluoróforos incorporados na reação. A quantidade de fluorescência emitida diretamente proporcional à quantidade do produto amplificado. Os dois métodos mais usados para a deteção e quantificação do produto incluem os corantes intercalares e as sondas de sequência específica, cujo sinal de fluorescência é detetado pelo laser do termociclador (Carriço et al. 2013). A técnica que utiliza os resultados amplificação por qPCR para a avaliação dos padrões de metilação de *loci*, através da análise das curvas de *melting* dos fragmentos amplificados, é a *High-Resolution Melting* (HRM) (Wojdacz, Dobrovic, and Hansen 2008).

1.2.1.3.1.1.3.1. Análise HRM (*High-Resolution Melting Analysis*)

Uma das abordagens frequentemente utilizadas para a análise dos resultados obtidos na qPCR é a análise das curvas de *melting*. A dissociação da dupla cadeia de ADN é conhecida como desnaturação ou *melting*, podendo ser induzida pelo aumento da temperatura ou por métodos químicos. A quebra da ligação tripla de hidrogénio entre citosina e guanina requer mais energia do que a dissociação da ponte dupla de hidrogénio entre timina e adenina. Portanto, as sequências ricas em conteúdo GC separam-se a temperaturas mais elevadas comparativamente a sequências com conteúdo predominante AT. O *melting* de um fragmento de ADN consiste nas sucessivas dissociações da cadeia e cuja temperatura de *melting* difere consoante o conteúdo de GC presente (Worm, Aggerholm, and Guldberg 2001; Dugast-darzacq and Grange 2009).

O perfil de *melting* de um *amplicon* pode ser determinado pelo aumento da temperatura na presença de corantes intercalantes, que emitem fluorescência quando ligados à dsADN. Inicialmente, observam-se níveis elevados da fluorescência, uma vez que o corante saturou o fragmento amplificado. Com o aumento gradual da temperatura, as cadeias de ADN começam a separar-se, libertando o corante e, conseqüentemente observa-se uma diminuição abrupta da fluorescência. A temperatura na qual 50 % do ADN se apresenta em dupla cadeia e o restante em cadeia simples é designada por temperatura de *melting* (T_m) do *amplicon* (Figura 9) (Wojdacz and Dobrovic 2007; Sun et al. 2016).

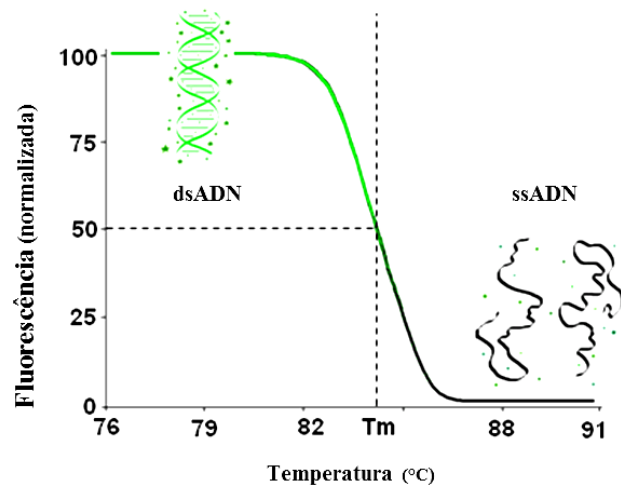


Figura 9 - Exemplo de uma curva de *melting*. Com o aumento da temperatura observa-se uma diminuição da fluorescência resultante da dissociação da dupla cadeia de ADN. A temperatura de *melting* (T_m) é a temperatura à qual 50 % do ADN está em cadeia dupla e 50 % em cadeia simples. Adaptado de Worm et al. (2001).

A identificação de variações genéticas em sequências de ADN é realizada por *High-resolution melting* (HRM ou HRMA). Esta técnica baseia-se na análise das curvas de *melting* dos fragmentos amplificados obtidas após a qPCR. Esta metodologia foi aplicada pela primeira vez, em 2001, por Worm et al. em estudos de metilação do ADN (Worm, Aggerholm, and Guldberg 2001). No entanto, esta apresentou várias limitações relativas ao corante utilizado, o SYBR Green I, dado que ocorria uma redistribuição deste durante a dissociação das cadeias (Figura 10). Para tal, surgiram corantes saturantes como o LCGreen, Syto[®]9, ResoLight e EvaGreen que melhoraram a resolução desta técnica (Wojdacz and Dobrovic 2007; Sun et al. 2016).

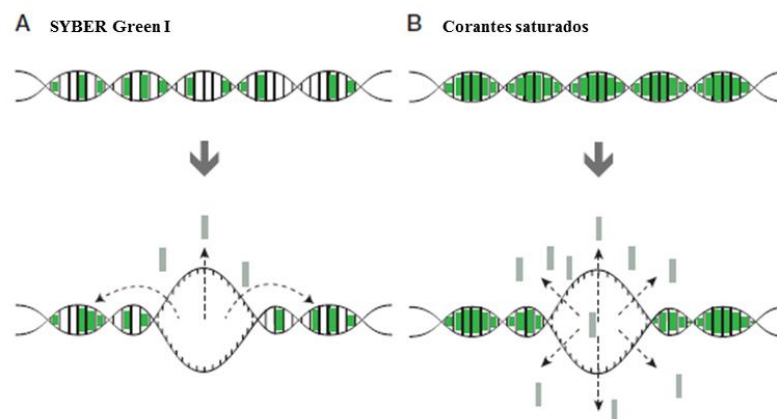


Figura 10 - Processo de libertação de corantes não saturados (A) e saturados (B), durante a dissociação das cadeias de ADN. Adaptado de Sun et al. (2016).

Esta técnica de qPCR acoplada à análise HRM, para a avaliação do estado de metilação de *amplicons*, foi utilizada por Stewart et al. (2015) para a distinção de gêmeos monozigóticos. Através da análise das curvas de *melting*, foi possível verificar diferenças na temperatura de *melting* dos produtos, como consequência da variação dos padrões de metilação nos fragmentos das amostras (Stewart et al. 2015).

2. Objetivos

Nas últimas décadas, a procura de novos métodos de determinação da idade tornou-se uma tarefa imperativa e de extrema importância nas Ciências Forenses. O potencial valor da metilação do ADN tem vindo a proporcionar alguns avanços consideráveis, sendo atualmente considerado um importante indicador biológico para a estimativa da idade.

Esta dissertação teve como objetivos principais: 1) a otimização de uma metodologia de previsão da idade de amostras biológicas, com base na análise dos padrões de metilação dos promotores de três *loci* (EDARADD, NPTX2 e TOM1L1) recorrendo à técnica de amplificação por qPCR e, respetiva análise por HRM, e 2) a avaliação do grau de metilação global de ADN ao longo do envelhecimento.

Numa primeira etapa deste estudo, foram avaliadas várias metodologias com o intuito de otimizar uma abordagem de previsão da idade a vários níveis, desde os métodos de extração e conversão do ADN até à amplificação dos *loci* em estudo e correspondente análise HRM. Após a otimização e seleção das metodologias que apresentaram melhores resultados, estas foram testadas num conjunto de amostras (4 - 81 anos), permitindo avaliar a aplicabilidade da análise HRM numa metodologia de estimativa da idade.

3. Material e Métodos

3.1. Amostragem populacional e Recolha de ADN

Neste estudo, o material biológico utilizado foi a saliva (células do epitélio bucal). Para a otimização da metodologia de previsão da idade, foram recolhidas amostras do mesmo indivíduo, através de 3 métodos distintos de recolha/armazenamento do ADN, representados na Tabela 2. Para a recolha de saliva pelo método *Oragene*[®] DNA (DNA Genotek), procedeu-se ao enchimento de um tubo coletor com saliva. Este possui um líquido estabilizador do material genético. Na recolha das células do epitélio bucal, foi utilizado um *OmniSwab*TM (Whatman[®]), tendo sido posteriormente armazenado num tubo a 4 °C. Foram ainda recolhidas células epiteliais da boca com um *FoamSwab* (Whatman[®]) e armazenadas num cartão *FTA*[®] *Classic Cards* (Whatman[®]), à temperatura ambiente.

Tabela 2 - Métodos de recolha/armazenamento e extração utilizados.

| Método de Recolha / Armazenamento | Material Biológico | Método de Extração |
|--|---------------------------|---|
| <i>Oragene</i> [®] DNA (DNA Genotek) | Saliva | <i>Oragene</i> [®] DNA/saliva (DNA Genotek) |
| <i>OmniSwab</i> TM (Whatman [®]) | Células do epitélio bucal | Fenol-Clorofórmio adaptado de Dong et al. (2012) |
| | | Chelex [®] 100 adaptado de Walsh et al. (2013) |
| <i>FTA</i> [®] <i>Classic Cards</i> (Whatman [®]) | Células do epitélio bucal | |

Para a validação das metodologias selecionadas, foram recolhidas amostras de 6 indivíduos de diferentes idades (4 – 81 anos) pelos métodos *Oragene*[®] DNA (DNA Genotek) e *OmniSwab*TM (Whatman[®]). A recolha das amostras realizou-se através de colaborações voluntárias e sob consentimento informado (Anexo I). As informações relativas ao dador, tais como a sua data de nascimento, naturalidade e doenças foram compiladas numa ficha de dados antropológicos, de carácter anónimo e confidencial.

3.2. Extração de ADN

Segundo a Tabela 2, para cada método de recolha/armazenamento foi efetuado o correspondente método de extração de ADN.

3.2.1. Protocolos de extração de ADN

3.2.1.1. Extração de ADN através do protocolo para a purificação do ADN através do *kit de recolha Oragene® DNA* (DNA Genotek)

A extração de ADN, através dos kits de recolha *Oragene® DNA* (DNA Genotek), iniciou-se com mistura da amostra de saliva no *kit* de recolha, por inversão durante alguns segundos, e posterior incubação da amostra a 50 °C durante 1 hora. Seguidamente, 500 µL de amostra foram transferidos para um tubo, no qual foram adicionados 20 µL de *PT-L2P*. As amostras foram vortexadas e incubadas no gelo, durante 10 minutos. Para a eliminação de impurezas presentes no tubo, a amostra foi centrifugada durante 5 minutos a 13000 rpm e transferidos 500 µL de sobrenadante para um novo tubo. Adicionou-se igual volume de etanol absoluto (100 %) e misturou-se por inversão. Para a precipitação do ADN, incubou-se a amostra, à temperatura ambiente, durante 10 minutos, seguida de uma centrifugação a 13000 rpm, durante 2 minutos, e posterior remoção do sobrenadante. Foram adicionados 250 µL de etanol a 70% ao tubo, seguido de uma incubação durante 1 minuto, à temperatura ambiente, e sua posterior remoção. Para a hidratação completa do *pellet* de ADN, foram adicionados 50 µL da solução TE e, consecutiva incubação a 50 °C durante 1 hora, vortexando-se a amostra ocasionalmente. As amostras de ADN extraídas foram conservadas a – 20 °C para posterior uso.

3.2.1.2. Extração de ADN pelo método de Fenol-Clorofórmio

O método de extração de ADN por Fenol-Clorofórmio foi realizado segundo o procedimento descrito por Dong et al. (2012) (Dong, Lv, and Lai 2012).

Ao tubo de reação contendo o *OmniSwab™* (Whatman®) adicionaram-se 500 µL de Tampão DBL para solubilizar os compostos. Seguidamente, procedeu-se à desnaturação e hidrólise das proteínas pela adição de 50 µL de SDS 10 % e 5 µL de Proteínase K (20 mg/mL). Após incubação *overnight* a 56 °C, com agitação ligeira, acrescentaram-se 20 µL de NaCl 5M. Para a remoção das proteínas desnaturadas, adicionaram-se 575 µL de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) e incorporou-se a mistura por inversão. Após a centrifugação a 12000 rpm durante 3 minutos, recolheu-se a fase superior para um novo tubo, no qual se adicionaram 575 µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). A mistura voltou a ser novamente centrifugada a 12000 rpm,

durante 3 minutos, e extraída a fase superior para um novo tubo. Para a purificação do ADN, adicionaram-se 1000 µL de etanol a 96 °C (armazenado a – 20 °C). Após 1 hora de repouso a – 20 °C, centrifugou-se a 10500 rpm durante 15 minutos. Posteriormente, retirou-se o etanol e deixou-se secar o precipitado. Por fim, a amostra foi hidratada com 100 µL de H₂O e incubada a 37 °C durante 2 horas. As amostras de ADN extraídas foram conservadas a – 20 °C para posterior uso.

3.2.1.3. Extração de ADN pelo método adaptado de Chelex® 100

O método de extração de ADN por Chelex® 100 foi adaptado do procedimento descrito por Walsh et al. (2013) (Walsh, Metzger, and Higuchi 2013).

A extração de ADN por este método iniciou-se com a recolha de dois *micropunchs* de cartão *FTA® Classic Cards* (Whatman®) para um tubo. Por outro lado, recolheu-se um *OmniSwab™* (Whatman®) num tubo. Adicionaram-se 1000 µL de água destilada, a cada tubo de reação. Após a incubação durante 30 minutos, à temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas, durante 3 minutos, a 14000 rpm. Seguidamente, retiraram-se 975 µL de sobrenadante e adicionaram-se 175 µL de Chelex 5%, incubando a 56 °C durante 30 minutos. Finalizada a incubação, agitou-se vigorosamente, no vórtex, as amostras durante 10 segundos e voltou-se a incubar a 99 °C, durante 8 minutos. As amostras foram novamente vortexadas e centrifugadas a 14000 rpm, durante 3 minutos e armazenadas a – 20 °C para posterior uso.

3.3. Quantificação e Análise da pureza do ADN extraído

A deteção e quantificação de ADN é uma etapa fucral para as subseqüentes aplicações do trabalho biológico em estudo. Para tal, procedeu-se à verificação da existência de material genético nas amostras, através de dois métodos distintos: a fluorimetria (Qubit™) e a espectrofotometria (Nanodrop™ 1000).

3.3.1. Quantificação do ADN por Fluorimetria (Qubit™)

Para a quantificação das amostras pelo método de fluorimetria, utilizou-se o fluorómetro *Qubit™ Fluorometer* (Invitrogen) com o kit *Quant-iT™ BR assay* (Invitrogen). Este é um método de quantificação fluorimétrica que combina um fluorímetro com ensaios de quantificação baseados em fluorescência elevadamente sensíveis para cadeia dupla de ADN e de precisão para amostras com concentrações entre 100 pg/µL e 1000 ng/µL.

Procedeu-se à preparação de uma solução *Quant-iTTM*, composta por 199 μL de Tampão *Quant-iTTM* e 1 μL de Reagente *Quant-iTTM*, por cada amostra em estudo. Em seguida, foram preparados os *standards* por adição de 10 μL da solução *standard* do *kit* a 190 μL da solução de trabalho. Por sua vez, a preparação das amostras realizou-se, da mesma forma, pela adição de 10 μL de amostra extraída a 190 μL da solução de trabalho. Posteriormente, os tubos contendo os *standards* e as amostras foram vortexados, durante 3 segundos, e incubados à temperatura ambiente, durante 2 minutos. Para a determinação da quantificação do ADN, ligou-se o *QubitTM Fluorometer* (Invitrogen) e selecionou-se a opção “*dsDNA BR assay Kit*” (para 2-1000 ng de ADN) e, seguidamente, “*Run new calibration*” para efetuar a calibração com a leitura dos dois *standards* e, posteriormente, das amostras. O valor apresentado no ecrã a cada leitura corresponde à concentração de ácidos nucleicos no tubo de reação. Assim, para obter a concentração da amostra, multiplicou-se o valor apresentado pelo fator de diluição (volume total/volume utilizado de amostra).

3.3.2. Quantificação e avaliação da pureza (NanoDropTM 1000)

Na quantificação das amostras pelo método de espectrofotometria, o *NanoDropTM 1000* (Thermo Scientific) mede a concentração e a pureza dos ácidos nucleicos com elevada precisão e reprodutibilidade. 1 μL de amostra é pipetado na extremidade de um cabo de fibra ótica (fibra recetora). Um segundo cabo de fibra ótica é colocado em contacto com a amostra fazendo com que esta preencha o espaço entre as duas extremidades da fibra ótica. Uma lâmpada de xénon pulsado fornece a fonte de luz e o espectrómetro, utilizando um sensor CCD linear, é usado para analisar a luz depois de esta passar através da amostra. O instrumento está acoplado a um computador com um *software* onde os dados recolhidos são registados.

Para a quantificação das amostras, selecionou-se o módulo de ácidos nucleicos no *software* do computador e realizou-se a calibração com o tampão onde se encontra diluído o ADN (segundo cada protocolo de extração utilizado). A leitura da concentração e pureza do ADN foi posteriormente realizada, aplicando 1 μL de amostra para a determinação da concentração e pureza do ADN.

A razão de absorvância a 260/280 é usada para avaliar a pureza do ADN, sendo que o valor aceite é ~ 1.8 para ADN considerado puro. Caso este valor seja menor, pode ser indicador da presença de proteínas ou outros contaminantes, por exemplo o fenol, que absorve próximo de 280nm. A razão de absorvância da amostra a 260/230 é considerada uma medição secundária da pureza dos ácidos nucleicos. Para considerar o ADN puro, o seu valor deve ser superior ao valor da razão da absorvância a 260/280, ou seja, num intervalo de 1.8 – 2.2.

3.4. Conversão do ADN pelo método de bissulfito

A capacidade de detetar e quantificar a metilação do ADN, de forma eficiente e precisa, é um fator essencial para este estudo. A técnica mais comumente usada é o método de conversão por bissulfito. Esta técnica envolve o tratamento do ADN metilado com bissulfito, convertendo as citosinas não metiladas em uracilos. Uma vez convertido, o perfil de metilação do ADN pode ser determinado por análises pós-PCR.

3.4.1. Protocolos de Conversão de ADN

3.4.1.1. Conversão do ADN através do protocolo do *kit EpiJET Bisulfite Conversion* (Thermo Scientific)

O protocolo do *kit EpiJET Bisulfite Conversion* (Thermo Scientific) integra num passo a desnaturação térmica do ADN e a reação de conversão por bissulfito. O ADN convertido é ligado a uma membrana de uma coluna, onde ocorre a dessulfonação e, subsequente, purificação. O ADN eluído da matriz da coluna é adequado para técnicas moleculares que recorrem à análise do estado de metilação das amostras.

A um tubo de 1,5 mL contendo 20 µL de amostra de ADN foram adicionados 120 µL do reagente de conversão e misturada a solução por pipetagem. Para desnaturar e converter o ADN, os tubos foram colocados no termobloco a 98 °C por 10 minutos e, em seguida, a 60 °C durante 150 minutos. A uma coluna (*DNA Purification Micro Column*), colocada num tubo de recolha, foram adicionados 400 µL de *Binding Buffer*, onde também foi carregada a amostra de ADN e misturada por pipetagem. A coluna foi centrifugada a 12000 rpm, durante 30 segundos, e descartou-se o líquido presente no tubo. Foram adicionados 200 µL de *Wash Buffer* à coluna e centrifugados a 12000 rpm, durante 30 segundos, tendo sido descartado o líquido presente no tubo. Posteriormente, procedeu-se dessulfonação pela adição de 200 µL de *Desulfonation Buffer* à coluna e, conseqüente incubação à temperatura ambiente, durante 20 minutos. Após a centrifugação da coluna a 12000 rpm, durante 30 segundos, procedeu-se à adição de 200 µL de *Wash Buffer* e esta foi novamente centrifugada a 12000 rpm durante 30 segundos. Esta lavagem da coluna seguida de centrifugação foi novamente repetida. Por fim, a coluna foi colocada num tubo de reação e 10 µL de *Elution Buffer* foram adicionados à matriz desta, tendo sido centrifugada a 12000 rpm, durante 60 segundos, para a eluição do ADN convertido. A amostra foi armazenada a – 20 °C para análises posteriores.

3.4.1.2. Conversão do ADN através do protocolo do kit *EZ DNA Methylation-GoldTM* (Zymo Research)

O protocolo do *kit EZ DNA Methylation-GoldTM* (Zymo Research) simplifica a conversão das citosinas não metiladas em uracilos. Este integra a desnaturação do ADN e a conversão por bissulfito num único passo, usando a temperatura de desnaturação em substituição da desnaturação química com hidróxido de sódio. Por outro lado, o ADN é purificado e dessulfonado simultaneamente usando colunas de centrifugação (“*spin columns*”) e, posteriormente, eluído para análises moleculares.

Num tubo de reação, foram adicionados 130 µL do reagente de conversão *CT* a 20 µL da amostra de ADN. A solução preparada foi misturada por pipetagem e centrifugou-se para que esta ficasse no fundo do tubo. Posteriormente, os tubos foram colocados no termobloco a 98 °C por 10 minutos e, conseqüentemente 150 minutos a 64 °C. A uma coluna *Zymo-SpinTM IC* (colocada num tubo de recolha) foram adicionados 600 µL de *M-Binding Buffer*. Após a amostra, previamente preparada, ter sido carregada na coluna, foi misturada por inversão e centrifugada a 14000 rpm, durante 30 segundos, descartando-se o líquido presente no tubo. À coluna adicionaram-se 100 µL de *M-Wash Buffer* e centrifugou-se a 14000 rpm, durante 30 segundos. Posteriormente, procedeu-se à dessulfonação da amostra pela adição de 200 µL de *M-Desulphonation Buffer* e incubação à temperatura ambiente, durante 20 minutos. Após a centrifugação da coluna a 14000 rpm, durante 30 segundos, procedeu-se a duas lavagens consecutivas por adição de 200 µL de *M-Wash Buffer* e centrifugação a 14000 rpm por 30 segundos. Para a eluição do ADN convertido, a coluna foi colocada num tubo de reação de 1,5 mL e adicionaram-se 10 µL de *M-Elution Buffer* na sua matriz. Depois de esta ter sido centrifugada durante 30 segundos a 14000 rpm, a amostra de ADN foi armazenada a – 20 °C.

3.5. Amplificação do ADN convertido

A amplificação do ADN foi realizada em *Singleplex* para a análise dos padrões de metilação dos promotores dos 3 *loci* em estudo – EDARADD, NPTX2 e TOM1L1, tal como no estudo realizado por Bocklandt et al. (2011) (Bocklandt, Lin, and Sehl 2011). Em cada amplificação, para além das amostras normalizadas (20 ng/µL), foram incluídos controlos positivos para a metilação (ADN humano 100 % metilado - Abcam) e negativos para a contaminação da reação.

3.5.1. Amplificação do ADN com o *kit* de amplificação *Taq PCR Core kit* (Qiagen)

Para os promotores dos genes NPTX2 e TOM1L1 foi realizada uma 1ª amplificação por *nested* PCR, com o objetivo de eliminar produtos não específicos da amplificação. Nesta amplificação foi utilizado o *kit Taq PCR Core* (Qiagen), sendo que a plataforma de PCR usada foi o termociclador *iCycler™* (Bio-Rad).

Para a amplificação das amostras, foi preparada uma solução *Master Mix* constituída pelos componentes e respetivos volumes descritos na Tabela 3, em função do número de amostras e controlos em estudo. Após a distribuição de 24 µL da *Master Mix*, por cada tubo, foi adicionado 1 µL de ADN das amostras ou 1 µL de controlos (negativo e positivo), perfazendo um volume total de 25 µL. Os *primers* usados para a amplificação de cada marcador encontram-se descritos na Tabela 4.

Tabela 3 - Constituintes e respetivos volumes necessários na preparação da *Master Mix* com o *kit* de amplificação *Taq PCR Core kit* (Qiagen).

| Componentes da <i>Master Mix</i> | Volume (µL) por amostra |
|----------------------------------|-------------------------|
| Água ultra pura | 18,8 |
| <i>PCR Buffer 10x</i> | 2,5 |
| dNTPs | 0,5 |
| <i>Primer Forward</i> | 1 |
| <i>Primer Reverse</i> | 1 |
| <i>Taq DNA Polymerase</i> | 0,2 |
| ADN | 1 |

Tabela 4 - Informações relativas aos *primers* dos promotores dos genes NPTX2 e TOM1L1: a sua identificação, sequência, tamanho do fragmento produzido, temperatura de *annealing* e indicação da sua referência bibliográfica.

| Promotor do Gene alvo | <i>Primer</i> | Sequência 5' – 3' | Tamanho do fragmento (pb) | Temperatura de <i>annealing</i> (°C) | Referência |
|-----------------------|----------------|--|---------------------------|--------------------------------------|-------------------------------|
| NPTX2 | <i>Forward</i> | TAG TTT AAG AAA GGG | 271 | 42 | Bocklandt, Lin, and Sehl 2011 |
| | <i>Reverse</i> | AAC TAT CCT AAA CCC CAA C | | | |
| TOM1L1 | <i>Forward</i> | TTA ATT TAT TGT AGA ATT TT | 220 | 41 | Bocklandt, Lin, and Sehl 2011 |
| | <i>Reverse</i> | AAA CCT CCT CTT CTA ATC TAT AAA AC | | | |

As condições de amplificação utilizadas foram as recomendadas pelo protocolo do *kit* de amplificação usado e estão descritas na Tabela 5. A temperatura de *annealing* usada para cada marcador (NPTX2 e TOM1L1) encontra-se descrita na Tabela 4.

Tabela 5 - Condições de amplificação do ADN segundo o *kit* de amplificação *Taq PCR Core kit* (Qiagen). A temperatura de *annealing* (*) encontra-se descrita na Tabela 4.

| Etapas do Ciclo | Temperatura (°C) | Tempo | Número de Ciclos |
|-------------------------------------|------------------|--------|------------------|
| Desnaturação Inicial | 95 | 5 min | 1 |
| Desnaturação do ADN | 95 | 30 seg | 35 |
| <i>Annealing</i> dos <i>primers</i> | * | 60 seg | |
| Extensão da cadeia de ADN | 72 | 40 seg | |
| Extensão final | 72 | 10 min | 1 |

3.5.2. Amplificação do ADN com *kit* de amplificação *Luminaris Color HRM Master Mix* (Thermo Scientific)

A amplificação do ADN por qPCR para os três promotores de genes (EDARADD, NPTX2 e TOM1L1) foi realizada em *Singleplex*, recorrendo a um *kit* de amplificação apropriado para a deteção precisa de variações na sequência de ADN, essencial para a análise HRM, o *Luminaris Color HRM Master Mix* (Thermo Scientific). Este *kit* contém uma *Hot Start Taq* ADN polimerase num tampão otimizado com um corante saturado *EvaGreenTM*, cujos espectros de excitação e emissão são semelhantes ao do fluoróforo *SYBR[®] Green I*, 500 nm e 530 nm, respetivamente. A plataforma de PCR usada foi o termociclador *CFX96TM Real-Time PCR* (Bio-Rad), sendo que os dados foram analisados pelo *software Bio-Rad CFX Manager 2.0* (Bio-Rad).

Para a amplificação do ADN, foi preparada uma solução *Master Mix* constituída pelos componentes e respetivos volumes descritos na Tabela 6, em função do número de amostras e controlos em estudo. Após a distribuição de 9 µL da *Master Mix*, por cada poço da *strip*, foi adicionado 1 µL de ADN das amostras ou 1 µL de controlos (negativo e positivo), perfazendo um volume total de 10 µL. Os *primers* usados para a amplificação de cada marcador encontram-se descritos na Tabela 7, sendo que para os marcadores NPTX2 e TOM1L1, os *primers* (*forward* e *reverse*) não se encontram descritos na literatura.

Tabela 6 - Constituintes e respectivos volumes necessários na preparação da *Master Mix* do kit de amplificação *Luminaris Color HRM Master Mix* (Thermo Scientific).

| Componentes da Master Mix | Volume (µL) por amostra |
|---------------------------|-------------------------|
| <i>Master Mix</i> (2x) | 5 |
| <i>Primer Forward</i> | 0,5 |
| <i>Primer Reverse</i> | 0,5 |
| Água Ultra Pura | 3 |
| ADN | 1 |

Tabela 7 - Informações relativas aos *primers* dos promotores dos genes EDARADD, NPTX2 e TOM1L1: a sua identificação, sequência, tamanho do fragmento produzido, temperatura de *annealing* e indicação da sua referência bibliográfica.

| Promotor do Gene alvo | <i>Primer</i> | Sequência 5' – 3' | Tamanho do fragmento (pb) | Temperatura de <i>annealing</i> (°C) | Referência |
|-----------------------|----------------|---|---------------------------|--------------------------------------|-------------------------------|
| EDARADD | <i>Forward</i> | GGT AGA TTA AGA GGA AGT TTA TTT TTT TAT | 231 | 57 | Bocklandt, Lin, and Sehl 2011 |
| | <i>Reverse</i> | AAT ACC TCT CCC CAT CTA TTT AAT C | | | |
| NPTX2 | <i>Forward</i> | GGT AGG AGA TTT TTG TTT | 196 | 53,5 | - |
| | <i>Reverse</i> | AAC TAT CCT AAA CCC CAA C | | | |
| TOM1L1 | <i>Forward</i> | GGG GAG TGG AAT TAA ATA GGT GAA T | 166 | 46,5 | - |
| | <i>Reverse</i> | AAA CCT CCT CTT CTA ATC TAT AAA AC | | | |

As condições de amplificação utilizadas foram as recomendadas pelo protocolo do *kit* de amplificação usado e estão descritas na Tabela 8. A temperatura de *annealing* usada para cada marcador (EDARADD, NPTX2 e TOM1L1) encontra-se descrita na Tabela 7.

Tabela 8 - Condições de amplificação do ADN segundo o kit de amplificação *Luminaris Color HRM Master Mix* (Thermo Scientific). A temperatura de *annealing* (*) encontra-se descrita na Tabela 7.

| Etapas do Ciclo | Temperatura (°C) | Tempo | Número de Ciclos |
|-------------------------------------|-------------------------|-----------------------------|-------------------------|
| Desnaturação Inicial | 95 | 10 min | 1 |
| Desnaturação do ADN | 95 | 10 seg | 40 |
| <i>Annealing</i> dos <i>primers</i> | * | 30 seg | |
| Extensão da cadeia de ADN | 72 | 30 seg | |
| Formação de <i>Heteroduplex</i> | 95 | 30 seg | 1 |
| | 50 | 30 seg | 1 |
| Curva de <i>Melting</i> | 65 - 95 | Incrementos de 0,2 °C/2 seg | |

3.6. Electroforese em gel de agarose (2 %)

Para a verificação da amplificação, os fragmentos de ADN obtidos foram corridos num gel de agarose a 2 %.

Para a preparação do gel de agarose (a 2 %), pesaram-se 2 g de *Agarose* (Lonza) aos quais se adicionou 100 mL de TBE 1x (Lonza). A mistura foi aquecida no micro-ondas para a dissolução completa da agarose. Posteriormente, foram adicionados 4 µL de *GelRed* (Biotium). A mistura obtida foi vertida numa moldeira nivelada, contendo um pente para a formação dos poços. Após a polimerização do gel de agarose, este foi colocado numa tina de electroforese preenchida com TBE 1x. As amostras de ADN amplificado a carregar, nos poços, foram preparadas pela adição de 5 µL de amostra de ADN amplificada a 1 µL de 6x *Orange DNA Loading Dye*. Para determinar o tamanho do fragmento amplificado, deve ser corrido o marcador molecular (*ladder*), para tal adicionaram-se 4 µL de água ultra pura a 2 µL de *Ready Ladder™ 50 bp DNA Marker* (Amresco).

Os poços foram carregados com as amostras e o marcador molecular. Por fim, o gel foi posto a correr com uma corrente de 130 V e 400 A, durante 35 minutos. Uma vez terminada a corrida, o gel foi observado no transluminador, *Gel Image System*, *Biodoc IT* (UVP) e fotografado.

3.7. Análise HRM

A análise HRM é uma análise quantitativa das curvas de *melting* dos fragmentos de obtidos na amplificação por PCR. Os perfis das curvas de *melting* gerados permitem distinguir as amostras baseadas em diferenças na sequência de ADN possibilitando a análise da metilação. Esta análise foi realizada com o *software Precision Melt AnalysisTM* 1.0 (Bio-Rad).

3.8. Quantificação do estado global de metilação das amostras com o kit *MethylFlashTM*

Methylated DNA Quantification – Colorimetric (EPIGENTEK)

Este *kit* permite quantificar o conteúdo absoluto de ADN metilado e determinar o estado de metilação relativo de amostras de ADN. A fração de ADN metilado é detetada usando captura e deteção de anticorpos específicos para 5-metilcitosina e, consequentemente quantificada colorimetricamente por leitura da absorvância num espectrofotómetro, onde a quantidade de ADN metilado é proporcional à intensidade da densidade ótica medida.

Inicialmente, foram preparadas as diluições dos controlos positivos pela adição de controlo positivo e de solução TE, de acordo com a Tabela 9, para a elaboração da curva *standard*.

Tabela 9 - Preparação dos controlos positivos para a curva *standard*.

| Tubo | Volume de Controlo Positivo (µL) | Volume de 1x TE (µL) | Concentração (ng/µL) |
|------|----------------------------------|----------------------|----------------------|
| 1 | 1 | 19 | 0,5 |
| 2 | 1 | 9 | 1 |
| 3 | 1 | 4 | 2 |
| 4 | 2,5 | 2,5 | 5 |
| 5 | 4 | 0 | 10 |

A cada poço da placa de ensaio, adicionou-se 80 µL de *Binding Solution*. Seguidamente, aplicou-se 1 µL de Controlo negativo, 1 µL das várias diluições efetuadas para os Controlos positivos e 1 µL de amostra, nos respetivos poços. Agitou-se a placa e selou-se com parafilme para a sua incubação a 37 °C, durante 90 minutos. Em seguida, removeu-se o *Binding Solution* e cada poço foi lavado 3 vezes com 150 µL de 1x *Wash Buffer*. Para a captura do ADN metilado, a cada poço foram adicionados 50 µL da solução *Capture Antibody* (diluída 1:1000 com 1x *Wash Buffer*) e, subsequente incubação à temperatura ambiente por 60 minutos. Ulteriormente, a solução foi removida e cada poço foi lavado 3 vezes consecutivas com 150 µL de 1x *Wash Buffer*. Após a

diluição de 1:2000 da solução *Detection Antibody* com 1x *Wash Buffer*, 50 µL foram adicionados a cada poço. Finalizada a incubação, durante 30 minutos à temperatura ambiente, a solução diluída de *Detection Antibody* foi retirada e cada poço foi lavado 4 vezes com 150 µL com 1x *Wash Buffer*. Posteriormente, foi diluído o *Enhancer Solution* (1:5000) com 1x *Wash Buffer*. A cada poço adicionaram-se 50 µL da solução preparada, seguida de incubação durante 30 minutos, à temperatura ambiente. A solução diluída de *Enhancer Solution* foi removida e os poços foram lavados 5 vezes com 150 µL de 1x *Wash Buffer*. Finalmente, procedeu-se à etapa de detecção do sinal, pela adição de 100 µL de *Developer Solution* e respetiva incubação durante 10 minutos sem a presença de luz, que revelará a presença de ADN metilado pela cor azul. Por fim, adicionaram-se 100 µL de *Stop Solution* e aguardaram-se 2 minutos para posterior leitura das absorvâncias a 450 nm.

4. Resultados e Discussão

4.1. Otimização da metodologia de determinação da idade do material biológico

4.1.1. Avaliação do ADN extraído das amostras

Após a recolha e armazenamento das células do epitélio bucal do mesmo indivíduo por *Oragene*[®] DNA (DNA Genotek), *OmniSwab*TM (Whatman[®]) e *FTA*[®] *Classic Cards* (Whatman[®]), o ADN foi extraído pelo respetivo método (Tabela 2). Os dados relativos aos valores de concentração e pureza do ADN extraído pelos diferentes métodos de extração estão descritos nas respetivas tabelas 10, 11, 12 e 13.

Relativamente à extração do ADN pelo método *Oragene*[®] DNA/saliva (DNA Genotek), a concentração média foi de 220,6 ng/μL e o valor de pureza médio (A_{260}/A_{280}) foi 1,73 (Tabela 10). Estes resultados indicam que este método permite obter uma concentração elevada de ADN com uma pureza elevada.

Tabela 10 - Valores da quantificação do ADN extraído pelo método *Oragene*[®] DNA/saliva (DNA Genotek).

| Qubit™ Fluorometer (Invitrogen) | | | |
|------------------------------------|----------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| Amostra | Concentração (µg/mL) | Concentração em 10 µL (µg/mL) | |
| EPI_OG ₁ | 2,51 | 50,3 | |
| EPI_OG ₂ | 2,45 | 49 | |
| NanoDrop™ 1000 (Thermo Scientific) | | | |
| Amostra | Concentração (ng/µL) | Pureza | |
| | | A ₂₆₀ /A ₂₈₀ | A ₂₆₀ /A ₂₃₀ |
| EPI_OG ₁ | 248,8 | 1,72 | 1,09 |
| EPI_OG ₂ | 192,4 | 1,74 | 1,04 |

Por outro lado, os dados obtidos pela extração do ADN do *OmniSwab*TM (Whatman[®]) pelo método de Fenol-Clorofórmio adaptado de Dong et al. (2012) permitiram identificar uma oscilação da concentração entre os 46,4 - 202,1 ng/μL e valores de pureza de 1,36 - 1,38 (Tabela 11).

Tabela 11 - Valores da quantificação do ADN recolhido por *OmniSwab*TM (Whatman[®]) e extraído pelo método Fenol-Clorofórmio.

| Qubit™ Fluorometer (Invitrogen) | | | |
|------------------------------------|----------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| Amostra | Concentração (µg/mL) | Concentração em 10 µL (µg/mL) | |
| EPI_FC ₁ | 0,085 | 1,7 | |
| EPI_FC ₂ | 0,107 | 2,14 | |
| NanoDrop™ 1000 (Thermo Scientific) | | | |
| Amostra | Concentração (ng/µL) | Pureza | |
| | | A ₂₆₀ /A ₂₈₀ | A ₂₆₀ /A ₂₃₀ |
| EPI_FC ₁ | 201,1 | 1,36 | 0,82 |
| EPI_FC ₂ | 46,4 | 1,38 | 0,59 |

Através da extração do ADN de um *OmniSwab*TM (Whatman[®]) pelo método de Chelex[®] 100 adaptado de Walsh et al. (2013), a concentração média obtida foi de 138,4 ng/µL e um valor médio da razão A₂₆₀/A₂₈₀ de 1,18 (Tabela 12).

Tabela 12 - Valores da quantificação do ADN recolhido por *OmniSwab*TM (Whatman[®]) e extraído pelo método Chelex[®] 100.

| Qubit™ Fluorometer (Invitrogen) | | | |
|------------------------------------|----------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| Amostra | Concentração (µg/mL) | Concentração em 10 µL (µg/mL) | |
| EPI_C _x S ₁ | 0,274 | 5,49 | |
| EPI_C _x S ₂ | 0,191 | 3,82 | |
| NanoDrop™ 1000 (Thermo Scientific) | | | |
| Amostra | Concentração (ng/µL) | Pureza | |
| | | A ₂₆₀ /A ₂₈₀ | A ₂₆₀ /A ₂₃₀ |
| EPI_C _x S ₁ | 174,3 | 1,13 | 0,41 |
| EPI_C _x S ₂ | 102,5 | 1,22 | 0,46 |

Na Tabela 13, encontram-se descritos os valores da concentração de ADN obtidos pela extração do *FTA*[®] *Classic Cards* (Whatman[®]) pelo método de Chelex[®] 100 adaptado de Walsh et al. (2013). Estes são bastante díspares relativamente à concentração de ADN (13,2 - 103,7), bem como os respetivos valores de pureza (0,42 - 1,04).

Tabela 13 - Valores da quantificação do ADN recolhido por *FTA® Classic Cards* (Whatman®) e extraído pelo método *Chelex® 100*.

| <i>Qubit™ Fluorometer</i> (Invitrogen) | | | |
|---|----------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| Amostra | Concentração (µg/mL) | Concentração em 10 µL (µg/mL) | |
| EPI_C _x FTA ₁ | <0,01 | - | |
| EPI_C _x FTA ₂ | <0,01 | - | |
| <i>NanoDrop™ 1000</i> (Thermo Scientific) | | | |
| Amostra | Concentração (ng/µL) | Pureza | |
| | | A ₂₆₀ /A ₂₈₀ | A ₂₆₀ /A ₂₃₀ |
| EPI_C _x FTA ₁ | 13,2 | 0,42 | 0,25 |
| EPI_C _x FTA ₂ | 103,7 | 1,04 | 0,96 |

A comparação dos valores obtidos de rendimento e pureza do ADN extraído encontra-se compilada nas Figuras 11 e 12. Verificou-se que o método de recolha/extração com maior rendimento e pureza de ADN extraído foi o método de Oragene® DNA/saliva (DNA Genotek). Este método difere substancialmente dos restantes, uma vez que a extração de ADN foi realizada a partir de saliva recolhida para um tubo (com um líquido estabilizador), ao invés de cotonetes orais ou de *FTA® Classic Cards* (Whatman®). Para além de ser considerado um sistema multiformato para a recolha, estabilização e transporte de ADN, a extração está otimizada num processamento automático para aplicações subsequentes dependentes da elevada qualidade do ADN obtido (Nunes et al. 2012). No entanto, este método de recolha/extração possui custos mais elevados comparativamente aos restantes métodos testados. Relativamente ao rendimento da extração, os outros três métodos apresentaram valores similares, no entanto, a pureza do ADN extraído é baixa, em comparação com os valores recomendados (~1,8), indicando a presença de contaminantes, tais como o fenol e o Chelex utilizados nas extrações de ADN.

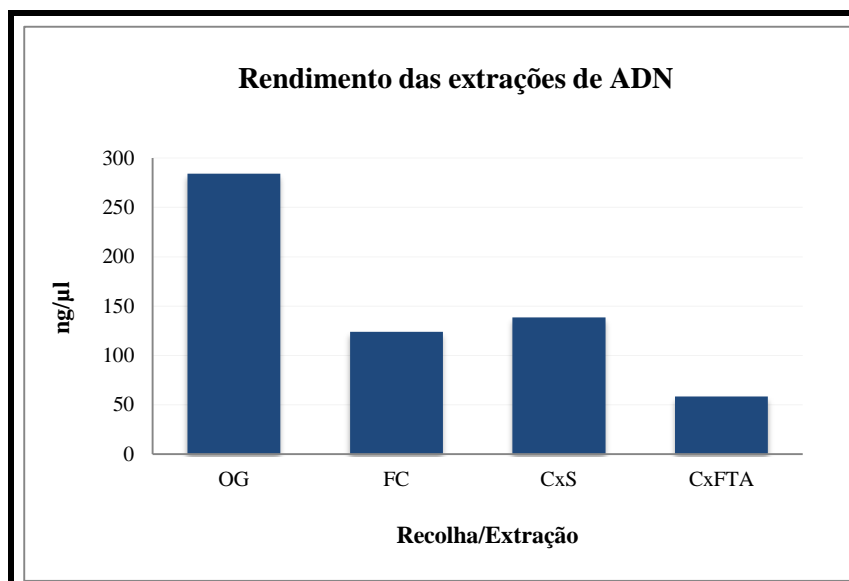


Figura 11 - Gráfico representativo do rendimento obtido através dos quatro métodos de recolha/extração. OG – Método de extração Oragene® DNA/Saliva (DNA Genotek); FC – Método de extração por Fenol-Clorofórmio de um *OmniSwab*™ (Whatman®); CxS – Método de extração por Chelex® 100 de um *OmniSwab*™ (Whatman®); CxFTA – Método de extração por Chelex® 100 de *FTA*® Classic Cards (Whatman®).

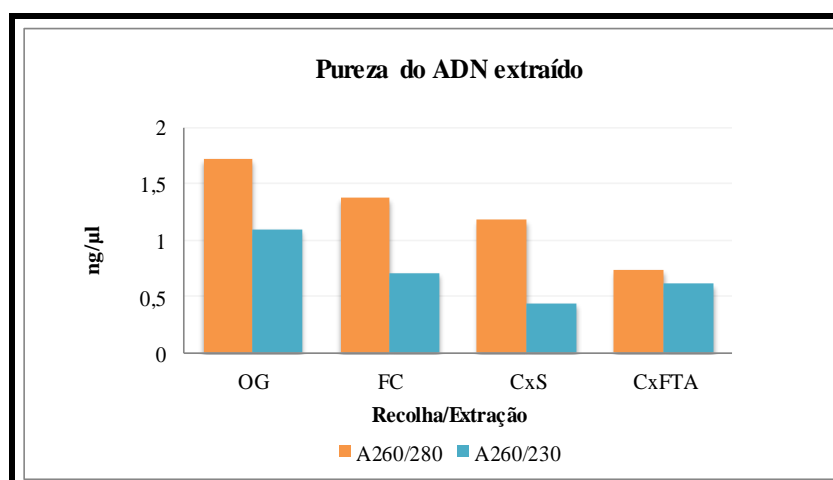


Figura 12 - Gráfico representativo da pureza do ADN extraído por quatro métodos de recolha/extração. OG – Método de extração Oragene® DNA/Saliva (DNA Genotek); FC – Método de extração por Fenol-Clorofórmio de um *OmniSwab*™ (Whatman®); CxS – Método de extração por Chelex® 100 de um *OmniSwab*™ (Whatman®); CxFTA – Método de extração por Chelex® 100 de *FTA*® Classic Cards (Whatman®).

4.1.2. Análise da concentração e pureza do ADN extraído (pós-modificação por bissulfito)

Após a extração de ADN pelos referidos métodos, as amostras foram convertidas por dois *kits* comerciais, *EpiJET Bisulfite Conversion* (Thermo Scientific) e *EZ DNA Methylation-GoldTM* (Zymo Research). Esta conversão é necessária para preservar o estado de metilação do ADN antes da reação de amplificação por PCR (Wojdacz, Dobrovic, and Hansen 2008).

Posteriormente à modificação química realizada por bissulfito, foram determinadas as concentrações de ADN de cada uma das amostras, no sentido de avaliar as perdas de ADN subjacentes a este tratamento. Os dados relativos aos valores de concentração e pureza do ADN convertido pelos dois *kits* estão descritos nas respetivas Tabelas 14, 15, 16 e 17.

Relativamente à concentração de ADN convertido, as amostras extraídas pelo método Oragene[®] DNA/saliva (DNA Genotek) e convertidas pelo *kit EZ DNA Methylation-GoldTM* (Zymo Research) apresentaram os valores mais elevados (Tabela 14 e Figura 13). Os valores de pureza observados são díspares entre os vários métodos de extração/*kits* de conversão e, por isso revelaram-se inconclusivos (Tabelas 14, 15, 16 e 17).

Tabela 14 - Dados da quantificação do ADN convertido e extraído pelo método Oragene[®] DNA/saliva (DNA Genotek).

| <i>EpiJET Bisulfite Conversion</i> (Thermo Scientific) | | | |
|---|----------------------|-------------------|-------------------|
| Amostra | Concentração (ng/μL) | Pureza | |
| | | A_{260}/A_{280} | A_{260}/A_{230} |
| EPI_OG ₁ -T | 48,8 | 2,5 | 0,55 |
| EPI_OG ₂ -T | 36,5 | 1,4 | 0,22 |
| <i>EZ DNA Methylation-GoldTM</i> (Zymo Research) | | | |
| Amostra | Concentração (ng/μL) | Pureza | |
| | | A_{260}/A_{280} | A_{260}/A_{230} |
| EPI_OG ₁ -Z | 278 | 1,8 | 1,23 |
| EPI_OG ₂ -Z | 263 | 2,05 | 2,13 |

Tabela 15 - Dados da quantificação do ADN convertido e extraído pelo método de Fenol-Clorofórmio de um *OmniSwab*TM (Whatman®).

| <i>EpiJET Bisulfite Conversion</i> (Thermo Scientific) | | | |
|--|----------------------|-------------------|-------------------|
| Amostra | Concentração (ng/μL) | Pureza | |
| | | A_{260}/A_{280} | A_{260}/A_{230} |
| EPI_FC ₁ -T | 6,8 | 4,74 | 0,05 |
| EPI_FC ₂ -T | 6,5 | 4,42 | 0,05 |
| <i>EZ DNA Methylation-Gold</i> TM (Zymo Research) | | | |
| Amostra | Concentração (ng/μL) | Pureza | |
| | | A_{260}/A_{280} | A_{260}/A_{230} |
| EPI_FC ₁ -Z | 0,8 | 0,36 | 7,39 |
| EPI_FC ₂ -Z | 18,4 | 1,35 | 0,87 |

Tabela 16 - Dados da quantificação do ADN convertido e recolhido por *OmniSwab*TM (Whatman®) e extraído pelo método Chelex® 100.

| <i>EpiJET Bisulfite Conversion</i> (Thermo Scientific) | | | |
|--|----------------------|-------------------|-------------------|
| Amostra | Concentração (ng/μL) | Pureza | |
| | | A_{260}/A_{280} | A_{260}/A_{230} |
| EPI_C _x S ₁ -T | 10,9 | 1,46 | 0,34 |
| EPI_C _x S ₂ -T | 5,2 | 2,28 | 0,06 |
| <i>EZ DNA Methylation-Gold</i> TM (Zymo Research) | | | |
| Amostra | Concentração (ng/μL) | Pureza | |
| | | A_{260}/A_{280} | A_{260}/A_{230} |
| EPI_C _x S ₁ -Z | 29,7 | 1,55 | 1,32 |
| EPI_C _x S ₂ -Z | 53,3 | 1,56 | 1,11 |

Tabela 17 - Dados da quantificação do ADN convertido e recolhido por *FTA® Classic Cards* (Whatman®) e extraído pelo método *Chelex® 100*.

| <i>EpiJET Bisulfite Conversion</i> (Thermo Scientific) | | | |
|--|----------------------|-------------------|-------------------|
| Amostra | Concentração (ng/μL) | Pureza | |
| | | A_{260}/A_{280} | A_{260}/A_{230} |
| EPI_C _x FTA ₁ -T | 21,9 | 2,57 | 0,11 |
| EPI_C _x FTA ₂ -T | 11,6 | 2,48 | 0,08 |
| <i>EZ DNA Methylation-Gold™</i> (Zymo Research) | | | |
| Amostra | Concentração (ng/μL) | Pureza | |
| | | A_{260}/A_{280} | A_{260}/A_{230} |
| EPI_C _x FTA ₁ -Z | 3,2 | 2,56 | 0,55 |
| EPI_C _x FTA ₂ -Z | 43,5 | 0,53 | 1,21 |

A comparação dos valores obtidos de ADN pré- e pós-conversão permite identificar um decréscimo na concentração de ADN após a modificação por bissulfito, em todas as amostras (Figura 13). Este facto pode ser explicado pela degradação do ADN durante a conversão devido a longos períodos de incubação, elevadas temperaturas e elevada molaridade do bissulfito. Assim, são introduzidas várias quebras na cadeia de ADN, resultando na sua fragmentação que pode comprometer as análises subsequentes (Ehrich et al. 2007; Genereux et al. 2009). Por outro lado, a eluição do ADN convertido é realizada com recurso a colunas, o que pode reter o ADN.

As amostras com maior concentração de ADN convertido foram as extraídas por Oragene® DNA/saliva (DNA Genotek) (Figura 13). Relativamente à utilização de dois *kits* de conversão, observou-se uma grande diferença entre os rendimentos obtidos nas amostras extraídas pelo método de Oragene® DNA/saliva (DNA Genotek), sugerindo que com a utilização do *kit EZ DNA Methylation-Gold™* (Zymo Research) se consiga obter um rendimento de ADN mais elevado comparativamente ao *kit EpiJET Bisulfite Conversion* (Thermo Scientific).

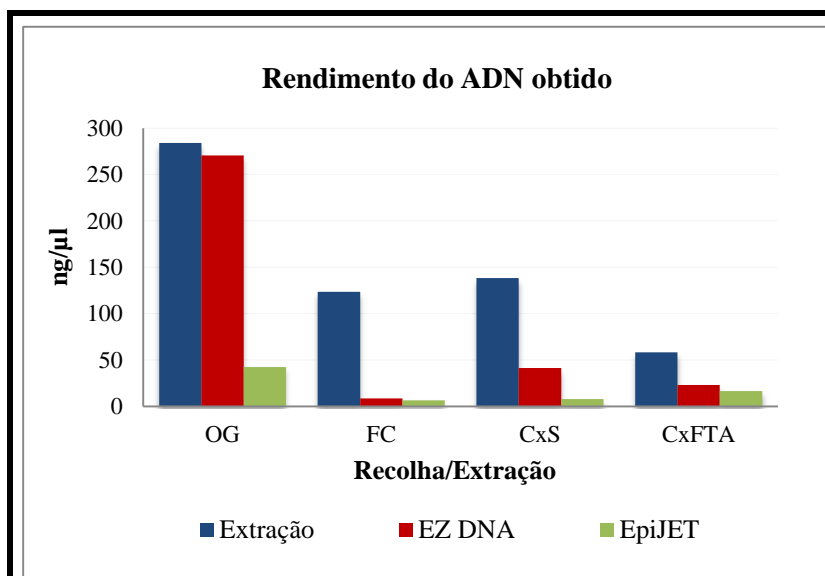


Figura 13 - Gráfico representativo dos rendimentos de ADN obtidos após a extração segundo os diferentes métodos de recolha/extração e após a conversão pelos kits comerciais *EpiJET Bisulfite Conversion* (Thermo Scientific) e *EZ DNA Methylation-Gold™* (Zymo Research). OG – Método de extração Oragene® DNA/Saliva (DNA Genotek); FC – Método de extração por Fenol-Clorofórmio de um *OmniSwab™* (Whatman®); CxS – Método de extração por Chelex® 100 de um *OmniSwab™* (Whatman®); CxFTA – Método de extração por Chelex® 100 de *FTA® Classic Cards* (Whatman®).

4.1.3. Avaliação da viabilidade da amplificação e análise HRM

Para a avaliação da viabilidade da amplificação e, posterior análise HRM das curvas de *melting* dos fragmentos amplificados relativos às amostras extraídas por diferentes métodos e convertidas por dois kits comerciais distintos, procedeu-se às amplificações por PCR dos três promotores de genes em estudo, EDARADD, NPTX2 e TOM1L1.

4.1.3.1. Marcador EDARADD

A amplificação das várias amostras de ADN para o promotor do gene EDARADD, por qPCR, gerou os resultados apresentados na Figura 14 e na Tabela 18. Verificou-se que a amplificação ocorreu nas amostras extraídas por Oragene® DNA/saliva (DNA Genotek) e convertidas por *EpiJET Bisulfite Conversion* (Thermo Scientific) e *EZ DNA Methylation-Gold™* (Zymo Research), bem como nas amostras extraídas pelo método de Chelex® 100 (*OmniSwab™* e *FTA® Classic Cards*) e convertidas por *EZ DNA Methylation-Gold™* (Zymo Research). Na Figura 14, observam-se as curvas de amplificação das respetivas amostras assinaladas a cores diferentes e, na Tabela 18, o número de ciclos no qual se iniciou a amplificação (*Cq*).

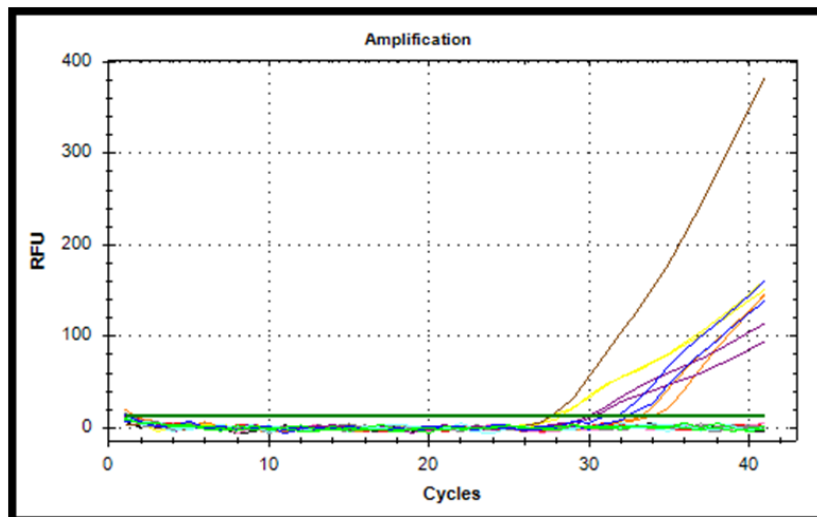


Figura 14 - Gráfico representativo das curvas de amplificação das amostras biológicas para o marcador EDARADD. A cada cor corresponde uma amostra: amarelo – EPI_OG-Z; laranja – EPI_OG-T; vermelho – EPI_Fc-Z; rosa – EPI_Fc-T; roxo – EPI_CxS-Z; azul - EPI_CxS-T; azul escuro - EPI_CxFTA-Z; verde - EPI_CxFTA-T; castanho – M-100%.

Tabela 18 - Tabela dos dados correspondentes às curvas de amplificação das amostras biológicas para o marcador EDARADD.

| Resultados da amplificação | | | |
|----------------------------|-------------------|-------------------------------|----------------|
| Amostra | Conteúdo | Fluoróforo | C _q |
| EPI_OG-Z | Amostra | <i>EvaGreen</i> TM | 27,68 |
| EPI_OG-Z | Amostra | <i>EvaGreen</i> TM | 28,21 |
| EPI_OG-T | Amostra | <i>EvaGreen</i> TM | 33,17 |
| EPI_OG-T | Amostra | <i>EvaGreen</i> TM | 33,79 |
| EPI_Fc-Z | Amostra | <i>EvaGreen</i> TM | - |
| EPI_Fc-Z | Amostra | <i>EvaGreen</i> TM | - |
| EPI_Fc-T | Amostra | <i>EvaGreen</i> TM | - |
| EPI_Fc-T | Amostra | <i>EvaGreen</i> TM | - |
| EPI_CxS-Z | Amostra | <i>EvaGreen</i> TM | 30,21 |
| EPI_CxS-Z | Amostra | <i>EvaGreen</i> TM | 29,91 |
| EPI_CxS-T | Amostra | <i>EvaGreen</i> TM | - |
| EPI_CxS-T | Amostra | <i>EvaGreen</i> TM | - |
| EPI_CxFTA-Z | Amostra | <i>EvaGreen</i> TM | 30,92 |
| EPI_CxFTA-Z | Amostra | <i>EvaGreen</i> TM | 32,38 |
| EPI_CxFTA-T | Amostra | <i>EvaGreen</i> TM | - |
| EPI_CxFTA-T | Amostra | <i>EvaGreen</i> TM | - |
| M-100% | Controlo Positivo | <i>EvaGreen</i> TM | 27,54 |
| NTC | NTC | <i>EvaGreen</i> TM | - |

Para a caracterização das amostras por HRM, foram analisadas as diferenças nas curvas de *melting* dos fragmentos obtidos na PCR, apenas das amostras que apresentaram curva de amplificação (Figura 15). Através da análise HRM, verificou-se que as amostras foram agrupadas no mesmo *cluster*, uma vez que não existem diferenças significativas nas curvas de *melting* (Tabela 19).

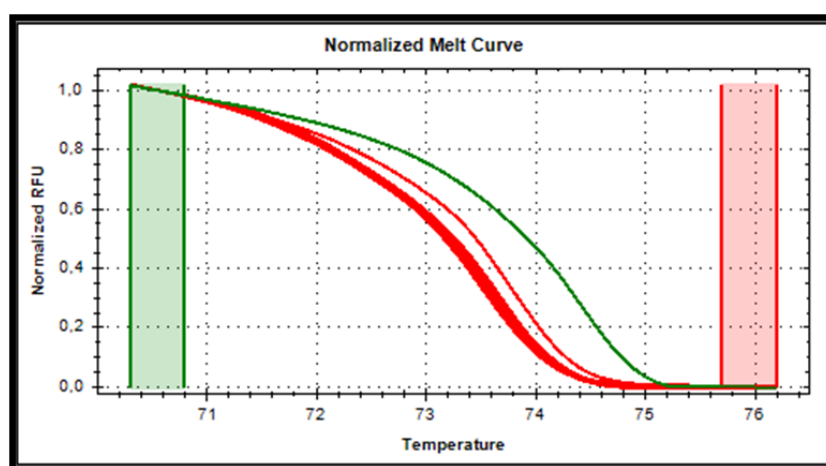


Figura 15 - Gráfico representativo das curvas de *melting* das amostras biológicas para o marcador EDARADD. A vermelho estão representadas as curvas de *melting* de todas as amostras que amplificaram o fragmento pretendido para o marcador EDARADD. A verde está representada a curva de *melting* do controlo positivo para a metilação (ADN humano 100 % metilado - Abcam).

Tabela 19 - Tabela dos dados correspondentes à análise HRM para o marcador EDARADD.

| Amostra | Conteúdo | Cluster | | Percentagem de confiança (%) |
|-------------|-------------------|---------|--|------------------------------|
| EPI_OG-Z | Amostra | 1 | | 99,4 |
| EPI_OG-Z | Amostra | 1 | | 99,0 |
| EPI_OG-T | Amostra | 1 | | 99,5 |
| EPI_OG-T | Amostra | 1 | | 98,2 |
| EPI_CxS-Z | Amostra | 1 | | 98,6 |
| EPI_CxS-Z | Amostra | 1 | | 99,5 |
| EPI_CxFTA-Z | Amostra | 1 | | 98,6 |
| EPI_CxFTA-Z | Amostra | 1 | | 97,7 |
| M-100% | Controlo Positivo | 2 | | 98,2 |

Em suma, a amplificação das amostras para o promotor de gene EDARADD permitiu identificar problemas na concentração de moléculas de ADN disponíveis para a amplificação, após a modificação por bissulfito. Todas amostras convertidas pelo *kit EpiJET Bisulfite Conversion* (Thermo Scientific), à exceção da amostra extraída por Oragene® DNA/saliva (DNA Genotek), não

amplificaram. Desta forma, pode concluir-se que este protocolo de conversão induz erros na amplificação por degradação do ADN. Por conseguinte, a metodologia a testar nos restantes marcadores deverá excluir a conversão pelo referido *kit*, à exceção da amostra extraída por Oragene® DNA/saliva (DNA Genotek).

4.1.3.2. Marcador NPTX2

A avaliação do marcador NPTX2 foi realizada por *nested*-PCR. Numa primeira fase, realizou um PCR convencional e verificou-se a amplificação de fragmentos não específicos em todas as amostras, à exceção de OG-T, num gel de agarose a 2 % (Figura 16).

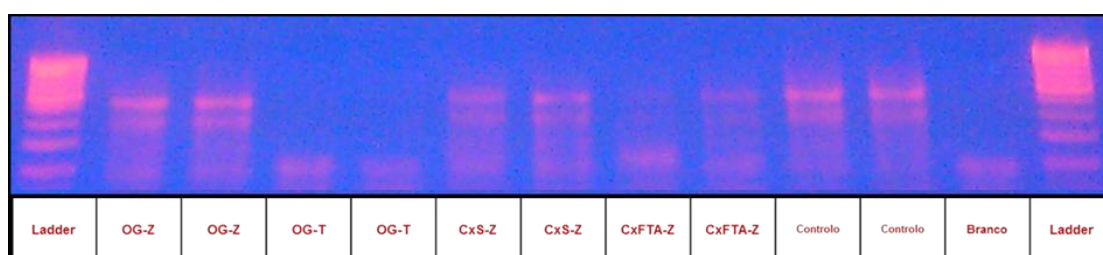


Figura 16 - Avaliação da amplificação por PCR convencional das amostras para o marcador NPTX2.

A amplificação das várias amostras de ADN para este marcador, por qPCR, gerou os resultados apresentados na Figura 17 e na Tabela 20. Verificou-se que ocorreu a amplificação do fragmento pretendido, em todas as amostras, entre os 5 e os 11 ciclos (Tabela 20).

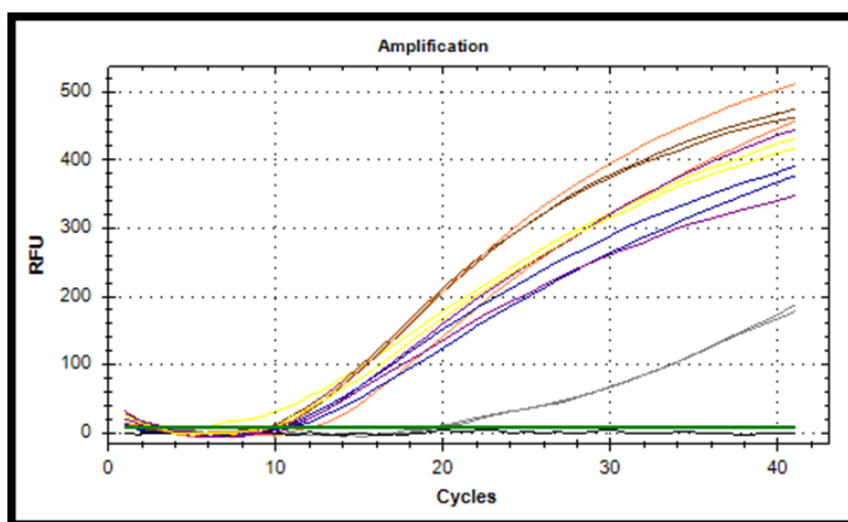


Figura 17 - Gráfico representativo das curvas de amplificação das amostras biológicas para o marcador NPTX2. A cada cor corresponde uma amostra: amarelo – EPI_OG-Z; laranja – EPI_OG-T; roxo – EPI_CxS-Z; azul escuro - EPI_CxFTA-Z; castanho – M-100 %; cinzento – NTC-PCR convencional.

Tabela 20 - Tabela dos dados correspondentes às curvas de amplificação das amostras biológicas para o marcador NPTX2.

| Resultados da amplificação | | | |
|----------------------------|-------------------|-------------------------------|----------------------|
| Amostra | Conteúdo | Fluoróforo | <i>C_q</i> |
| EPI_OG-Z | Amostra | <i>EvaGreen</i> TM | 5,13 |
| EPI_OG-Z | Amostra | <i>EvaGreen</i> TM | 9,37 |
| EPI_OG-T | Amostra | <i>EvaGreen</i> TM | 9,72 |
| EPI_OG-T | Amostra | <i>EvaGreen</i> TM | 11,95 |
| EPI_CxS-Z | Amostra | <i>EvaGreen</i> TM | 10,06 |
| EPI_CxS-Z | Amostra | <i>EvaGreen</i> TM | 10,84 |
| EPI_CxFTA-Z | Amostra | <i>EvaGreen</i> TM | 10,30 |
| EPI_CxFTA-Z | Amostra | <i>EvaGreen</i> TM | 10,42 |
| M-100% | Controlo Positivo | <i>EvaGreen</i> TM | 8,95 |
| NTC – PCR conv. | NTC | <i>EvaGreen</i> TM | 19,54 |
| NTC | NTC | <i>EvaGreen</i> TM | - |

A análise HRM das curvas de *melting* dos fragmentos obtidos para cada uma das amostras permitiu concluir que as diferenças de RFUs não são significativas e, por isso as amostras não podem ser diferenciadas (Figura 18 e Tabela 21).

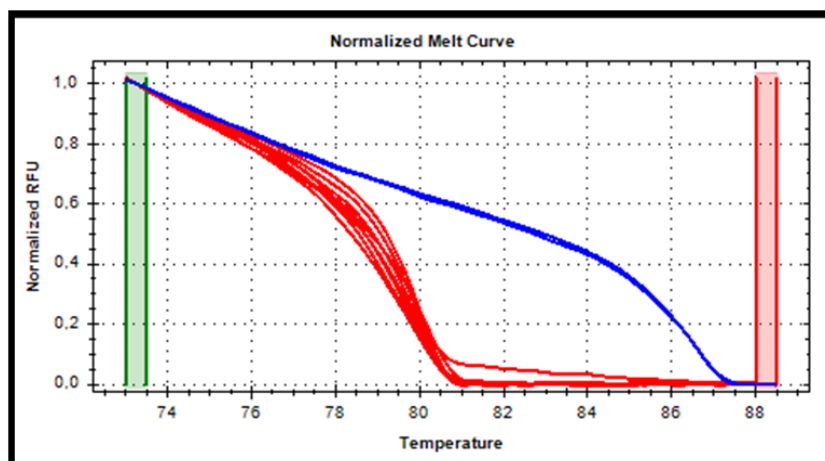


Figura 18 - Gráfico representativo das curvas de *melting* das amostras biológicas para o marcador NPTX2. A vermelho estão representadas as curvas de *melting* todas as amostras em estudo para o marcador NPTX2. A azul está representada a curva de *melting* para o controlo positivo para a metilação (ADN humano 100 % metilado - Abcam).

Tabela 21 - Tabela dos dados correspondentes à análise HRM para o marcador NPTX2.

| Amostra | Conteúdo | Cluster | | Percentagem de confiança (%) |
|-------------|-------------------|---------|--|------------------------------|
| EPI_OG-Z | Amostra | 1 | | 98,7 |
| EPI_OG-Z | Amostra | 1 | | 98,6 |
| EPI_OG-T | Amostra | 1 | | 97,8 |
| EPI_OG-T | Amostra | 1 | | 98,1 |
| EPI_CxS-Z | Amostra | 1 | | 97,7 |
| EPI_CxS-Z | Amostra | 1 | | 98,2 |
| EPI_CxFTA-Z | Amostra | 1 | | 98,9 |
| EPI_CxFTA-Z | Amostra | 1 | | 98,8 |
| M-100% | Controlo Positivo | 2 | | 98,8 |

Os resultados obtidos por análise HRM, para o marcador NPTX2, são idênticos aos resultados do marcador EDARADD, dado que estas amostras não apresentam diferenças significativas entre si e, desta forma foram agrupadas num único *cluster*.

4.1.3.3. Marcador TOM1L1

Para a análise do marcador TOM1L1, recorreu-se ao *nested*-PCR. Após a amplificação por PCR convencional, procedeu-se à avaliação desta por electroforese em gel de agarose a 2%. Na Figura 19, observou-se em todas as amostras um leve *smear* de fragmentos amplificados, sugerindo que a amplificação não foi específica para este marcador.

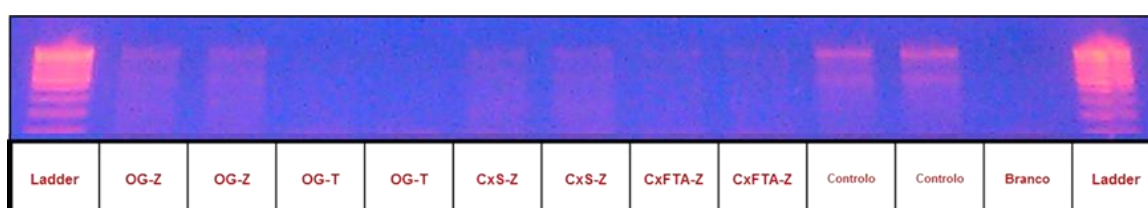


Figura 19 - Avaliação da amplificação por PCR convencional das amostras para o marcador TOM1L1.

Em seguida, procedeu-se à amplificação por qPCR das amostras de ADN previamente amplificadas. Na Figura 20, encontram-se representadas as curvas de amplificação das amostras. É possível constatar, na Tabela 22, que todas as amostras em estudo amplificaram e cujo *C_q* varia entre os 12 e os 23 ciclos.

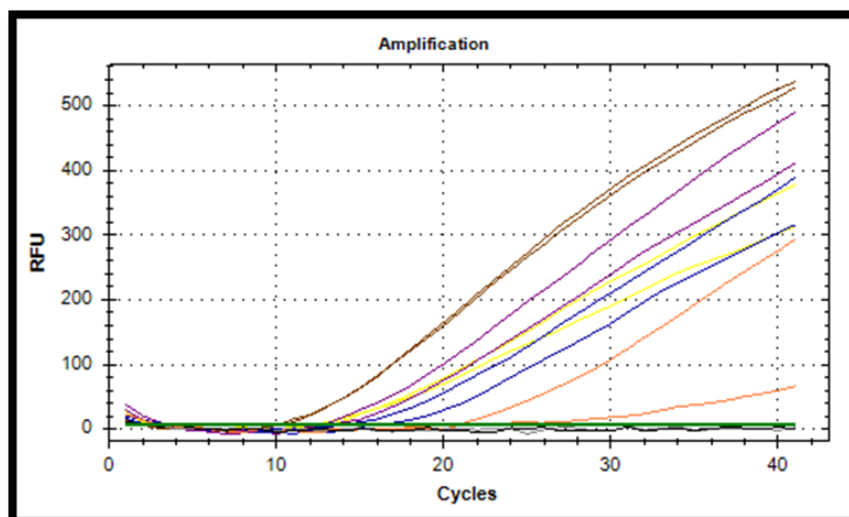


Figura 20 - Gráfico representativo das curvas de amplificação das amostras biológicas para o marcador TOM1L1. A cada cor corresponde uma amostra: amarelo – EPI_OG-Z; laranja – EPI_OG-T; roxo – EPI_CxS-Z; azul escuro - EPI_CxFTA-Z; castanho – M-100 %; cinzento – NTC-PCR convencional.

Tabela 22 - Tabela dos dados correspondentes às curvas de amplificação das amostras biológicas para o marcador TOM1L1.

| Resultados da amplificação | | | |
|----------------------------|-------------------|-------------------------------|-------|
| Amostra | Conteúdo | Fluoróforo | Cq |
| EPI_OG-Z | Amostra | <i>EvaGreen</i> TM | 12,23 |
| EPI_OG-Z | Amostra | <i>EvaGreen</i> TM | 13,04 |
| EPI_OG-T | Amostra | <i>EvaGreen</i> TM | 19,88 |
| EPI_OG-T | Amostra | <i>EvaGreen</i> TM | 23,13 |
| EPI_CxS-Z | Amostra | <i>EvaGreen</i> TM | 13,55 |
| EPI_CxS-Z | Amostra | <i>EvaGreen</i> TM | 12,70 |
| EPI_CxFTA-Z | Amostra | <i>EvaGreen</i> TM | 14,19 |
| EPI_CxFTA-Z | Amostra | <i>EvaGreen</i> TM | 15,65 |
| M-100% | Controlo Positivo | <i>EvaGreen</i> TM | 10,14 |
| NTC – PCR conv. | NTC | <i>EvaGreen</i> TM | - |
| NTC | NTC | <i>EvaGreen</i> TM | - |

A caracterização das amostras por HRM foi realizada pela análise das curvas de *melting* e respetivas diferenças de RFUs, permitindo diferenciá-las em grupos (Figura 21). Para o marcador TOM1L1, a análise HRM dos fragmentos amplificados permitiu a distinção das amostras em quatro *clusters* diferentes (Tabela 23). As amostras extraídas por Oragene[®] DNA/saliva (DNA Genotek) e por Chelex[®] 100 (*OmniSwab*TM) e convertidas pelo *kit EZ DNA Methylation-Gold*TM (Zymo Research) não apresentaram diferenças significativas entre si, pelo que foram incluídas no mesmo

grupo. As restantes amostras apresentaram variabilidade entre as réplicas (OG-T) ou diferenças significativas com os restantes *clusters* (CxFTA-Z) (Tabela 23).

Uma vez que as amostras pertencem ao mesmo indivíduo, os resultados obtidos não deveriam revelar diferenças entre metodologias. Desta forma, poderemos concluir que os diferentes métodos de extração e os *kits* de conversão estão na origem destas divergências, sendo o fator concentração de ADN o possível responsável.

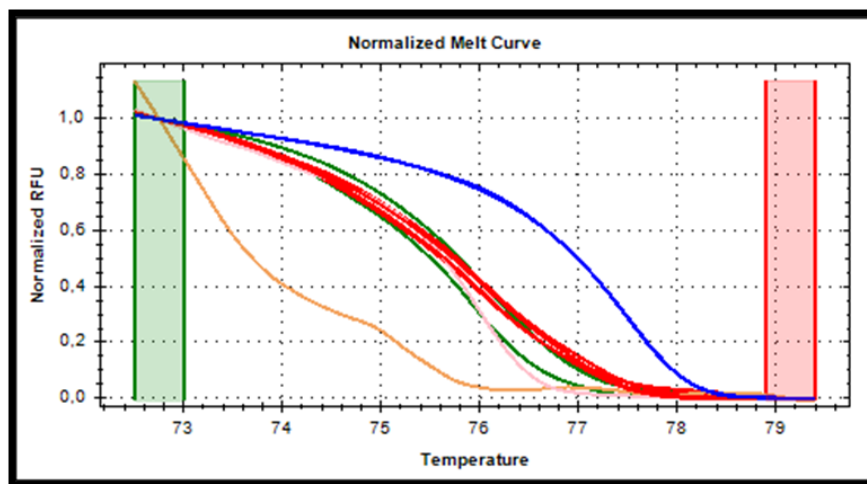


Figura 21 - Gráfico representativo das curvas de *melting* das amostras biológicas para o marcador TOM1L1. A vermelho - amostras extraídas por Oragene® DNA/saliva (DNA Genotek) e por Chelex® 100 (*OmniSwab*TM) e convertidas pelo *kit EZ DNA Methylation-Gold*TM (Zymo Research); a laranja e a rosa - amostras extraídas por Oragene® DNA/saliva (DNA Genotek) e convertidas pelo *kit EpiJET Bisulfite Conversion* (Thermo Scientific); a verde - amostras extraídas por Chelex® 100 (*FTA*[®] *Classic Cards*) e convertidas pelo *kit EZ DNA Methylation-Gold*TM (Zymo Research); a azul - controlo positivo para a metilação (ADN humano 100 % metilado - Abcam).

Tabela 23 - Tabela dos dados correspondentes à diferenciação das amostras por análise HRM para o marcador TOM1L1.

| Amostra | Conteúdo | Cluster | | Percentagem de confiança (%) |
|-------------|-------------------|---------|--|------------------------------|
| EPI_OG-Z | Amostra | 1 | | 99,9 |
| EPI_OG-Z | Amostra | 1 | | 99,9 |
| EPI_OG-T | Amostra | 2 | | 100,0 |
| EPI_OG-T | Amostra | 3 | | 100,0 |
| EPI_CxS-Z | Amostra | 1 | | 99,7 |
| EPI_CxS-Z | Amostra | 1 | | 99,7 |
| EPI_CxFTA-Z | Amostra | 4 | | 99,0 |
| EPI_CxFTA-Z | Amostra | 4 | | 99,0 |
| M-100% | Controlo Positivo | 5 | | 100,0 |

Para os três *loci* avaliados, as amostras extraídas por Oragene® DNA/saliva (DNA Genotek) e por Chelex® 100 (*OmniSwab*TM) e convertidas pelo *kit EZ DNA Methylation-Gold*TM (Zymo Research) apresentaram resultados de análise HRM idênticos para o mesmo indivíduo. Assim, pode concluir-se que a extração e a conversão pelo método de bissulfito são fatores essenciais para o sucesso de uma metodologia de análise da metilação do ADN destes marcadores por HRM. A concentração de ADN extraído é fulcral, já que as extrações por Oragene® DNA/saliva (DNA Genotek) e por Chelex® 100 (*OmniSwab*TM) foram as que obtiveram rendimentos mais elevados, permitindo acautelar a drástica diminuição de ADN nestas amostras, após a conversão. Desta forma, a aplicabilidade desta metodologia de estimativa da idade poderá ser restrita a indivíduos vivos, pelo que em vestígios, encontrados num local do crime, a concentração de ADN poderá não ser suficiente para a obtenção de resultados. Por outro lado, é importante verificar qual das duas metodologias otimizadas proporciona melhores resultados na previsão da idade, visto que os custos inerentes à recolha/extração do material biológico por Oragene® DNA/saliva (DNA Genotek) são superiores relativamente à recolha por *OmniSwab*TM (Whatman®) e extração pelo método de Chelex® 100.

Assim, estas duas metodologias foram selecionadas para a estimativa da idade, através da análise do estado de metilação dos promotores dos genes EDARADD, NPTX2 e TOM1L1 por HRM, num conjunto de amostras de seis indivíduos.

4.2. Avaliação das metodologias para a determinação da idade de amostras biológicas

Após a otimização e seleção das duas metodologias que proporcionaram os melhores resultados através da análise de HRM, estas foram avaliadas com um conjunto de amostras biológicas de diferentes idades (4 – 81 anos), com o intuito de determinar a idade através do estado de metilação de três marcadores EDARADD, NPTX2 e TOM1L1.

4.2.1. Avaliação da metodologia para a determinação da idade de amostras biológicas recolhidas por *Oragene*[®] DNA (DNA Genotek)

4.2.1.1. Avaliação do ADN extraído das amostras biológicas recolhidas por *Oragene*[®] DNA (DNA Genotek)

Após a recolha e armazenamento de saliva de seis indivíduos (4 - 81 anos) por *Oragene*[®] DNA (DNA Genotek), foi extraído o ADN de cada uma das amostras pelo método *Oragene*[®] DNA/saliva. Os dados relativos aos valores de concentração e pureza do ADN extraído de cada uma das amostras estão descritos na Tabela 24. As concentrações de ADN das amostras são bastante elevadas e os valores de pureza (A_{260}/A_{280}) variam entre 2 e 1,67, pelo que se pode concluir que o ADN extraído apresenta elevada pureza.

Tabela 24 - Valores da quantificação do ADN extraído pelo método *Oragene*[®] DNA/saliva (DNA Genotek).

| Qubit™ Fluorometer (Invitrogen) | | | | |
|------------------------------------|--------------|----------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| Amostra | Idade (anos) | Concentração (µg/mL) | Concentração em 10 µL (µg/mL) | |
| EPI_OG-1 | 4 | 3,7 | 73,9 | |
| EPI_OG-2 | 23 | 7,1 | 140 | |
| EPI_OG-3 | 32 | 1,06 | 21,3 | |
| EPI_OG-4 | 32 | > 10 | - | |
| EPI_OG-5 | 47 | > 10 | - | |
| EPI_OG-6 | 81 | 3,56 | 71,1 | |
| NanoDrop™ 1000 (Thermo Scientific) | | | | |
| Amostra | Idade (anos) | Concentração (ng/µL) | Pureza | |
| | | | A ₂₆₀ /A ₂₈₀ | A ₂₆₀ /A ₂₃₀ |
| EPI_OG-1 | 4 | 406,6 | 2 | 1,82 |
| EPI_OG-2 | 23 | 258,4 | 1,74 | 1,11 |
| EPI_OG-3 | 32 | 75,4 | 1,67 | 0,68 |
| EPI_OG-4 | 32 | 481,4 | 1,85 | 1,79 |
| EPI_OG-5 | 47 | 371,7 | 1,87 | 1,99 |
| EPI_OG-6 | 81 | 247,3 | 1,87 | 1,25 |

4.2.1.2. Análise da concentração e pureza do ADN extraído (pós-modificação por bissulfito)

Após a extração de ADN, as amostras foram convertidas pelo *kit* comercial *EZ DNA Methylation-GoldTM* (Zymo Research). Os dados relativos aos valores de concentração e pureza do ADN estão descritos na Tabela 25. Relativamente à concentração de ADN convertido obtido, observou-se uma diminuição concentração em todas as amostras, em comparação com os valores obtidos após a extração (Figura 22), tal como já havia sido observado aquando da otimização (Figura 13).

Tabela 25 - Dados da quantificação do ADN convertido e extraído pelo método Oragene[®] DNA/saliva (DNA Genotek).

| <i>EZ ADN Methylation-GoldTM</i> (Zymo Research) | | | |
|---|----------------------------|-------------------|-------------------|
| Amostra | Concentração (ng/ μ L) | Pureza | |
| | | A_{260}/A_{280} | A_{260}/A_{230} |
| EPI_OG-1 | 210,2 | 2,14 | 2,27 |
| EPI_OG-2 | 228,4 | 2,23 | 2,94 |
| EPI_OG-3 | 57,6 | 1,97 | 1,76 |
| EPI_OG-4 | 351,9 | 2,31 | 2,9 |
| EPI_OG-5 | 206,8 | 2,31 | 3,07 |
| EPI_OG-6 | 172,3 | 2,21 | 2,5 |

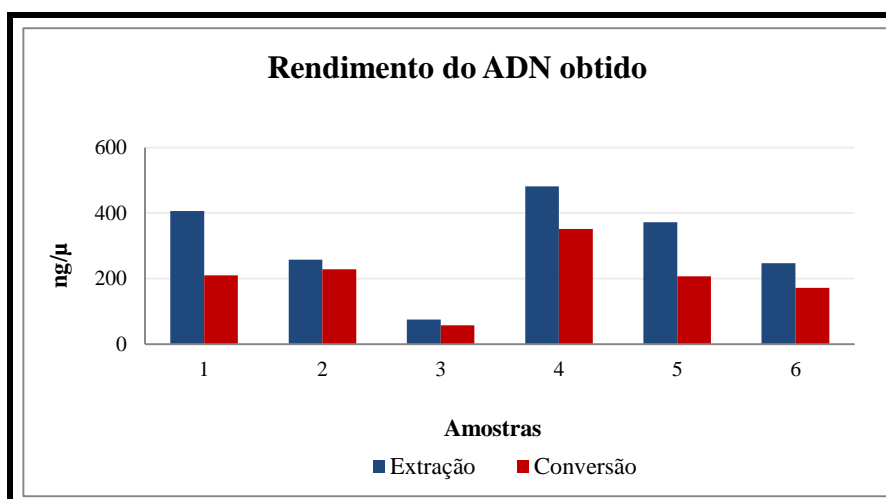


Figura 22 - Gráfico representativo dos rendimentos do ADN obtidos após a extração pelo método Oragene[®] DNA/saliva (DNA Genotek) e conversão pelo *kit* comercial *EZ DNA Methylation-GoldTM* (Zymo Research) das amostras.

4.2.1.3. Avaliação da viabilidade da amplificação e análise HRM

4.2.1.3.1. Marcador EDARADD

A amplificação das várias amostras de ADN, para o promotor do gene EDARADD, e consecutiva análise HRM, permitiu a distinção das amostras em quatro grupos diferentes, representados na Tabela 26. A amostra da criança de 4 anos foi diferenciada das restantes, bem como a amostra de 23 anos. Por outro lado, observou-se a formação de *cluster* constituído pelas amostras de idades compreendidas entre os 32 a 47 anos. A amostra de 81 anos foi também separada das restantes. A temperatura de *melting* dos fragmentos amplicados diminuiu com o envelhecimento, portanto este marcador torna-se hipometilado com o aumento da idade, tal como descrito por Bocklandt et al. (2011) (Bocklandt, Lin, and Sehl 2011). Assim, através da análise HRM, verificou-se que o estado de metilação é diferente em crianças, jovens, adultos e idosos.

Tabela 26 - Tabela dos dados correspondentes à diferenciação das amostras por análise HRM para o marcador EDARADD.

| Resultados da análise HRM | | | | | | |
|---------------------------|-----------------------|-------------------|------------------------------------|---------|--|------------------------------|
| Amostra | Informação da Amostra | Conteúdo | Temperatura de <i>melting</i> (°C) | Cluster | | Percentagem de confiança (%) |
| EPI_OG-1 | AGE-4 | Amostra | 73,6 | 1 | | 99,1 |
| EPI_OG-2 | AGE-23 | Amostra | 73,4 | 2 | | 83,7 |
| EPI_OG-3 | AGE-32_ANG | Amostra | 73,4 | 3 | | 97,7 |
| EPI_OG-4 | AGE-32 | Amostra | 73,4 | 3 | | 99,3 |
| EPI_OG-5 | AGE-47 | Amostra | 73,4 | 3 | | 99,5 |
| EPI_OG-6 | AGE-81 | Amostra | 73,4 | 4 | | 100,0 |
| M-100% | - | Controlo Positivo | 74,2 | 5 | | 98,6 |

4.2.1.3.2. Marcador NPTX2

A caracterização das amostras por HRM, para o marcador NPTX2, permitiu a formação de três *clusters* diferentes, representados na Tabela 27. Num primeiro grupo, ficaram agrupadas as amostras dos indivíduos com idades compreendidas entre os 4 e os 47 anos. No entanto, uma amostra de 32 anos de origem angolana diferenciou-se deste *cluster*, o que pode indicar que o fator ancestralidade possa influenciar o estado de metilação deste marcador. Por outro lado, esta amostra

pode ter um taxa de envelhecimento acelerado, na qual a idade cronológica não corresponde à idade biológica. Por fim, a amostra de 81 anos ficou num grupo diferente das demais.

Em suma, os resultados do marcador NPTX2, obtidos por HRM, permitem inferir que a análise do estado de metilação deste marcador não permite distinguir com clareza os vários grupos etários em estudo, uma vez que apenas distingue indivíduos idosos dos restantes.

Tabela 27 - Tabela dos dados correspondentes à diferenciação das amostras por análise HRM para o marcador NPTX2.

| Resultados da análise HRM | | | | | |
|---------------------------|-----------------------|-------------------|------------------------------------|---------|------------------------------|
| Amostra | Informação da Amostra | Conteúdo | Temperatura de <i>melting</i> (°C) | Cluster | Percentagem de confiança (%) |
| EPI_OG-1 | AGE-4 | Amostra | 79,6 | 1 | 98,4 |
| EPI_OG-2 | AGE-23 | Amostra | 79,6 | 1 | 99,8 |
| EPI_OG-3 | AGE-32_ANG | Amostra | 79 | 2 | 100,0 |
| EPI_OG-4 | AGE-32 | Amostra | 79,6 | 1 | 99,3 |
| EPI_OG-5 | AGE-47 | Amostra | 79,4 | 1 | 98,1 |
| EPI_OG-6 | AGE-81 | Amostra | 79,2 | 3 | 100,0 |
| M-100% | - | Controlo Positivo | 86,2 | 4 | 99,8 |

4.2.1.3.3. Marcador TOM1L1

Os resultados obtidos, por análise HRM, do promotor do gene TOM1L1 foram idênticos aos do marcador NPTX2, identificando três *clusters* (Tabela 28). As amostras de idades compreendidas entre os 4 e os 47 anos foram agrupadas, à exceção da amostra de 32 anos de origem angola. A amostra mais idosa, presente no estudo, foi colocada num grupo distinto.

Assim, pode concluir-se que o estado de metilação deste marcador, analisado por HRM, não permite a diferenciação dos grupos etários da amostragem, distinguindo apenas idosos da restante população. No entanto, os padrões de metilação deste promotor de gene podem ser influenciados por factores, tais como ancestralidade das amostras.

Tabela 28 - Tabela dos dados correspondentes à diferenciação das amostras por análise HRM para o marcador TOM1L1.

| Resultados da análise HRM | | | | | |
|---------------------------|-----------------------|-------------------|------------------------------------|---------|------------------------------|
| Amostra | Informação da Amostra | Conteúdo | Temperatura de <i>melting</i> (°C) | Cluster | Percentagem de confiança (%) |
| EPI_OG-1 | AGE-4 | Amostra | 75,6 | 1 | 99,4 |
| EPI_OG-2 | AGE-23 | Amostra | 75,6 | 1 | 99,9 |
| EPI_OG-3 | AGE-32_ANG | Amostra | 75,8 | 2 | 99,6 |
| EPI_OG-4 | AGE-32 | Amostra | 75,8 | 1 | 99,6 |
| EPI_OG-5 | AGE-47 | Amostra | 75,8 | 1 | 99,7 |
| EPI_OG-6 | AGE-81 | Amostra | 75,8 | 3 | 99,7 |
| M-100% | - | Controlo Positivo | 77 | 4 | 99,9 |

A metodologia de extração pelo método Oragene[®] DNA/saliva (DNA Genotek), conversão com o kit *EZ DNA Methylation-GoldTM* (Zymo Research) e análise HRM do estado de metilação dos fragmentos resultantes da amplificação apenas permitiu a distinção das amostras em grupos etários. O marcador EDARADD diferenciou quatro grupos: crianças, jovens, adultos e idosos, porém os restantes marcadores (NPTX2 e TOM1L1) apenas distinguiram os idosos da restante amostragem.

Assim, pode concluir-se que a abordagem HRM em estudos de previsão da idade aumenta a imprecisão, comparativamente à técnica de pirosequenciação utilizada num estudo de Bocklandt et al (2011), no qual foi reportado um erro de $\pm 5,2$ anos (Bocklandt, Lin, and Sehl 2011).

4.2.2. Validação da metodologia para a determinação da idade de amostras biológicas recolhidas por *OmniSwabTM* (Whatman[®]) e extraídas pelo método adaptado de Chelex[®] 100

4.2.2.1. Avaliação do ADN extraído das amostras biológicas recolhidas por *OmniSwabTM* (Whatman[®])

Após a recolha e armazenamento das células do epitélio bucal de seis indivíduos (4-81 anos) por *OmniSwabTM* (Whatman[®]), procedeu-se à extração de ADN de cada uma das amostras pelo método adaptado de Chelex[®] 100. Os dados relativos aos valores de concentração e pureza do ADN extraído estão descritos na Tabela 29. As concentrações de ADN das amostras são elevadas,

porém os valores de pureza (A_{260}/A_{280}) variam entre 1,49 e 0,89, podendo indicar a presença de contaminantes resultantes do processo de extração, por exemplo a resina utilizada – o Chelex.

Tabela 29 - Valores da quantificação do ADN extraído pelo método adaptado de Chelex® 100 das amostras.

| Qubit™ Fluorometer (Invitrogen) | | | | |
|------------------------------------|--------------|----------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| Amostra | Idade (anos) | Concentração (µg/mL) | Concentração em 10 µL (µg/mL) | |
| EPI_CxS-1 | 4 | 0,101 | 2,02 | |
| EPI_CxS-2 | 23 | 0,274 | 5,48 | |
| EPI_CxS-3 | 32 | 0,22 | 4,4 | |
| EPI_CxS-4 | 32 | 0,195 | 3,89 | |
| EPI_CxS-5 | 47 | 0,161 | 3,22 | |
| EPI_CxS-6 | 81 | 0,225 | 4,51 | |
| NanoDrop™ 1000 (Thermo Scientific) | | | | |
| Amostra | Idade (anos) | Concentração (ng/µL) | Pureza | |
| | | | A ₂₆₀ /A ₂₈₀ | A ₂₆₀ /A ₂₃₀ |
| EPI_CxS-1 | 4 | 59,4 | 1,16 | 0,42 |
| EPI_CxS-2 | 23 | 165,3 | 1,12 | 0,53 |
| EPI_CxS-3 | 32 | 103,9 | 1,49 | 0,71 |
| EPI_CxS-4 | 32 | 120,8 | 0,89 | 0,32 |
| EPI_CxS-5 | 47 | 158,8 | 1,4 | 0,55 |
| EPI_CxS-6 | 81 | 113,7 | 0,93 | 0,34 |

4.2.2.2. Análise da concentração e pureza do ADN extraído (pós-modificação por bissulfito)

Após a extração de ADN, as amostras foram convertidas pelo *kit* comercial *EZ DNA Methylation-Gold™* (Zymo Research). Os dados relativos aos valores de concentração e pureza do ADN estão descritos na Tabela 30. Relativamente à concentração obtida de ADN convertido, observou-se uma diminuição abrupta em todas as amostras, em comparação com os valores obtidos após a extração (Figura 23), tal como já tinha sido observado no processo de otimização (Figura 13).

Tabela 30 - Dados da quantificação do ADN convertido e extraído pelo método adaptado de Chelex[®] 100.

| <i>EZ ADN Methylation-GoldTM</i> (Zymo Research) | | | |
|---|----------------------------|-------------------|-------------------|
| Amostra | Concentração (ng/ μ L) | Pureza | |
| | | A_{260}/A_{280} | A_{260}/A_{230} |
| EPI_CxS-1 | 6,4 | 0,83 | 0,33 |
| EPI_CxS-2 | 19,2 | 1,68 | 0,87 |
| EPI_CxS-3 | 15,6 | 1,23 | 0,59 |
| EPI_CxS-4 | 113,7 | 1,11 | 0,83 |
| EPI_CxS-5 | 9,9 | 1,35 | 0,44 |
| EPI_CxS-6 | 53 | 1,45 | 0,58 |

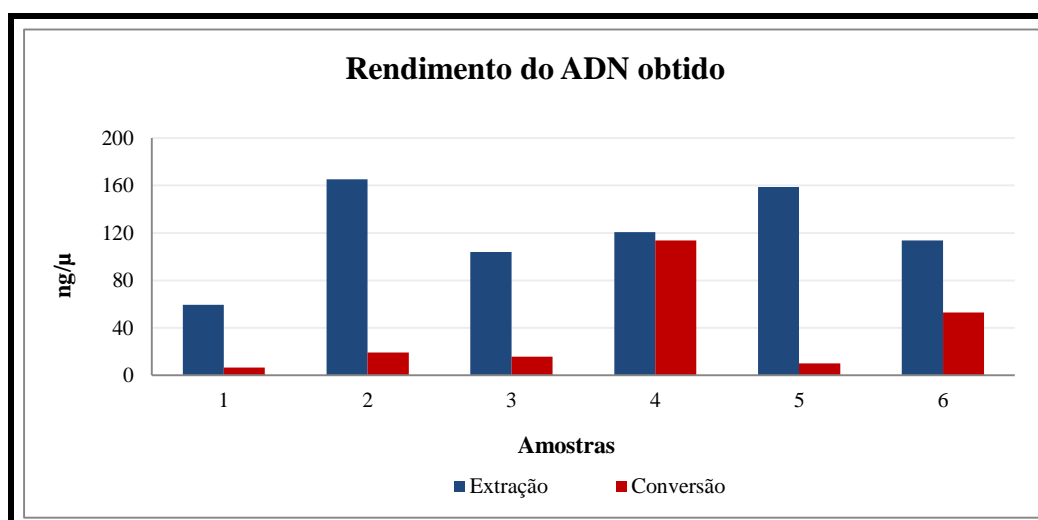


Figura 23 - Gráfico representativo dos rendimentos do ADN obtidos após a extração pelo método adaptado de Chelex[®] 100 e conversão pelo *kit* comercial *EZ DNA Methylation-GoldTM* (Zymo Research).

4.2.2.3. Avaliação da viabilidade da amplificação e análise HRM

4.2.2.1.1. Marcador EDARADD

A análise das curvas de *melting* dos fragmentos amplificados para o marcador EDARADD foi realizada por HRM e permitiu distinguir as amostras com base nos padrões de metilação. A amostra da criança foi diferenciada das restantes, apresentando uma temperatura de *melting* superior comparativamente às amostras em estudo, ou seja, esta amostra possui o *amplicon* mais metilado. O segundo *cluster* é constituído pelas amostras de 23, 32 e 47 anos, sendo que a amostra de 32 anos de origem angolana está agrupada com a amostra mais idosa. Os resultados obtidos para este *locus* apenas permitem efetuar uma distinção das crianças do restante conjunto, revelando-se pouco diferenciador na estimativa da idade (Tabela 31).

Tabela 31 - Tabela dos dados correspondentes à diferenciação das amostras por análise HRM para o marcador EDARADD.

| Resultados da análise HRM | | | | | |
|---------------------------|-----------------------|-------------------|------------------------------------|---------|------------------------------|
| Amostra | Informação da Amostra | Conteúdo | Temperatura de <i>melting</i> (°C) | Cluster | Percentagem de confiança (%) |
| EPI_CxS-1 | AGE-4 | Amostra | 73,8 | 1 | 98,3 |
| EPI_CxS-2 | AGE-23 | Amostra | 73,6 | 2 | 98,2 |
| EPI_CxS-3 | AGE-32_ANG | Amostra | 73,4 | 3 | 89,4 |
| EPI_CxS-4 | AGE-32 | Amostra | 73,6 | 2 | 98,2 |
| EPI_CxS-5 | AGE-47 | Amostra | 73,6 | 2 | 97,2 |
| EPI_CxS-6 | AGE-81 | Amostra | 73,4 | 3 | 97,4 |
| M-100% | - | Controlo Positivo | 74,2 | 4 | 99,9 |

4.2.2.1.2. Marcador NPTX2

A análise HRM das curvas de *melting* dos fragmentos amplificados do promotor do gene NPTX2 não permitiram analisar todas as amostras, uma vez que duas amostras não amplificaram e as respetivas curvas de *melting* não foram obtidas (Tabela 32). Por outro lado, a análise HRM revelou que não existem diferenças significativas nos padrões de metilação da criança e de um adulto (32 anos). Assim, esta metodologia demonstrou ser insuficiente na estimativa da idade de amostras biológicas.

Tabela 32 - Tabela dos dados correspondentes à diferenciação das amostras por análise HRM para o marcador NPTX2.

| Resultados da análise HRM | | | | | |
|---------------------------|-----------------------|-------------------|------------------------------------|---------|------------------------------|
| Amostra | Informação da Amostra | Conteúdo | Temperatura de <i>melting</i> (°C) | Cluster | Percentagem de confiança (%) |
| EPI_CxS-1 | AGE-4 | Amostra | 79,6 | 1 | 98,3 |
| EPI_CxS-2 | AGE-23 | Amostra | 79,6 | 2 | 98,9 |
| EPI_CxS-3 | AGE-32_ANG | Amostra | - | - | - |
| EPI_CxS-4 | AGE-32 | Amostra | 79,4 | 1 | 98,8 |
| EPI_CxS-5 | AGE-47 | Amostra | - | - | - |
| EPI_CxS-6 | AGE-81 | Amostra | 78 | 3 | 97,9 |
| M-100% | - | Controlo Positivo | 86,2 | 4 | 98,6 |

4.2.2.1.3. Marcador TOM1L1

Os padrões de metilação do *locus* TOM1L1 foram analisados por uma abordagem HRM, a qual diferenciou a amostragem em três grupos (Tabela 33). A amostra de 4 anos foi distinguida das restantes amostras do conjunto. Os indivíduos com idades compreendidas entre os 23 e 32 anos foram classificados num segundo grupo e, por último, as amostras de 47 e 81 anos não apresentaram diferenças nas curvas de *melting* obtidas e foram incluídas no mesmo *cluster*. Assim, pode concluir-se que este marcador permite a diferenciação das amostras em grupos etários, embora admita erros na estimativa da idade de indivíduos adultos.

Tabela 33 - Tabela dos dados correspondentes à diferenciação das amostras por análise HRM para o marcador TOM1L1.

| Resultados da análise HRM | | | | | |
|---------------------------|-----------------------|-------------------|------------------------------------|---------|------------------------------|
| Amostra | Informação da Amostra | Conteúdo | Temperatura de <i>melting</i> (°C) | Cluster | Percentagem de confiança (%) |
| EPI_CxS-1 | AGE-4 | Amostra | 74,8 | 1 | 97,2 |
| EPI_CxS-2 | AGE-23 | Amostra | 74,8 | 2 | 93,9 |
| EPI_CxS-3 | AGE-32_ANG | Amostra | 74,8 | 2 | 90,7 |
| EPI_CxS-4 | AGE-32 | Amostra | 74,8 | 2 | 95,9 |
| EPI_CxS-5 | AGE-47 | Amostra | 75 | 3 | 89,9 |
| EPI_CxS-6 | AGE-81 | Amostra | 74,8 | 3 | 69,0 |
| M-100% | - | Controlo Positivo | 77 | 4 | 97,4 |

Em suma, esta metodologia de extração do ADN pelo método adaptado de Chelex® 100, conversão com o *kit EZ DNA Methylation-Gold™* (Zymo Research) e análise da metilação dos respetivos *loci* por HRM não permite determinar a idade das amostras, nem efetuar uma correta distinção das amostras por grupos etários, à exceção do marcador TOM1L1. Desta forma, pode concluir-se que esta metodologia não deve ser utilizada em estudos de previsão da idade.

4.2.3. Avaliação do estado de metilação global do ADN das amostras biológicas

No sentido de complementar a informação obtida através da análise do estado de metilação dos promotores dos genes EDARADD, NPTX2 e TOM1L1, avaliou-se o estado de metilação global do ADN extraído das amostras com o *kit MethylFlash™ Methylated DNA Quantification – Colorimetric* (EPIGENTEK). Para tal, foi necessário definir uma curva padrão com os controlos de metilação do ADN de concentrações conhecidas (0; 0,5; 1; 2; 5 e 10 ng/μL) e respetivas densidades óticas (Tabela 34 e Figura 24). Através destes valores, foi possível obter uma reta por regressão linear, cujo valor de declive foi de 0,184. Este valor foi fundamental para a avaliação do estado de metilação do ADN de cada uma das amostras.

Tabela 34 - Dados obtidos para a elaboração da curva padrão da metilação global e respetivo declive da reta.

| Curva padrão da metilação | | | |
|---------------------------|----------------------|----------|---------|
| Controlo | Concentração (ng/μL) | Média OD | Declive |
| 1 | 0 | 0,057 | 0,184 |
| 2 | 0,5 | 0,373 | |
| 3 | 1 | 0,785 | |
| 4 | 2 | 1,043 | |
| 5 | 5 | 1,611 | |
| 6 | 10 | 2,072 | |

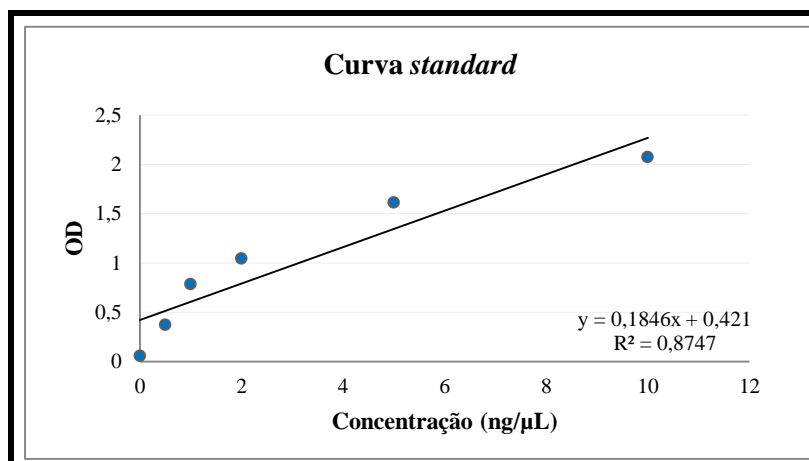


Figura 24 - Curva padrão da metilação global dos controlos e respetiva reta obtida por regressão linear e sua equação.

Após a determinação da densidade ótica, foi possível obter os valores de concentração da metilação global das amostras bem como a sua percentagem. Para a quantificação absoluta da metilação, foram utilizadas duas fórmulas distintas. Na Figura 25A, está descrita a fórmula que permitiu determinar a concentração de ADN metilado nas amostras. Através do valor obtido a partir da equação acima referida, é possível calcular a percentagem de ADN metilado pela equação da Figura 25B.

| | |
|----------|--|
| A | $5\text{-mC (ng)} = \frac{OD_{\text{Amostra}} - OD_{\text{Controlo negativo}}}{\text{Declive} \times 2}$ |
| B | $5\text{-mC \%} = \frac{[5\text{-mC}]}{\text{Declive}} \times 100 \%$ |

Figura 25 - Equações para a quantificação de ADN metilado. A – Equação para a determinação da concentração de ADN metilado – 5-mC (ng). OD_{Amostra} - valor da densidade ótica obtida em cada amostra; $OD_{\text{Controlo negativo}}$ – valor da densidade ótica do controlo negativo (concentração de 0 ng/μL); Declive – valor de obtido por regressão linear (0,184); O valor 2 é um fator de normalização da 5-metilcitosina do controlo positivo (100%). **B** – Equação descritiva da percentagem de metilação presente na amostra – 5-mC%. [5-mC] – valor de concentração de ADN metilado (resultado da equação acima).

Os resultados obtidos na determinação da metilação global das amostras extraídas por Oragene® DNA/saliva (DNA Genotek) estão descritos na Tabela 35. A partir dos valores de densidade ótica de cada uma das amostras, foi possível verificar que a concentração de metilação

global das amostras diminuiu com o aumento da idade e cuja Figura 26 permite observar esta tendência de diminuição da metilação com o envelhecimento nas amostras em estudo, tal como referenciado na literatura (Jones, Goodman, and Kobor 2015; Jung and Pfeifer 2015).

Tabela 35 - Dados obtidos relativamente ao estado de metilação global do ADN extraído pelo método Oragene® DNA/saliva (DNA Genotek).

| Dados da metilação global | | | | |
|---------------------------|--------------|----------|-----------|----------|
| Amostra | Idade (anos) | Média OD | 5-mC (ng) | 5-mC (%) |
| EPI_OG-1 | 4 | 0,945 | 2,411 | 1,878 |
| EPI_OG-2 | 23 | 0,898 | 2,283 | 0,884 |
| EPI_OG-3 | 32 | 0,856 | 2,170 | 0,627 |
| EPI_OG-4 | 32 | 0,793 | 1,999 | 0,593 |
| EPI_OG-5 | 47 | 0,650 | 1,611 | 0,434 |
| EPI_OG-6 | 81 | 0,628 | 1,550 | 0,415 |

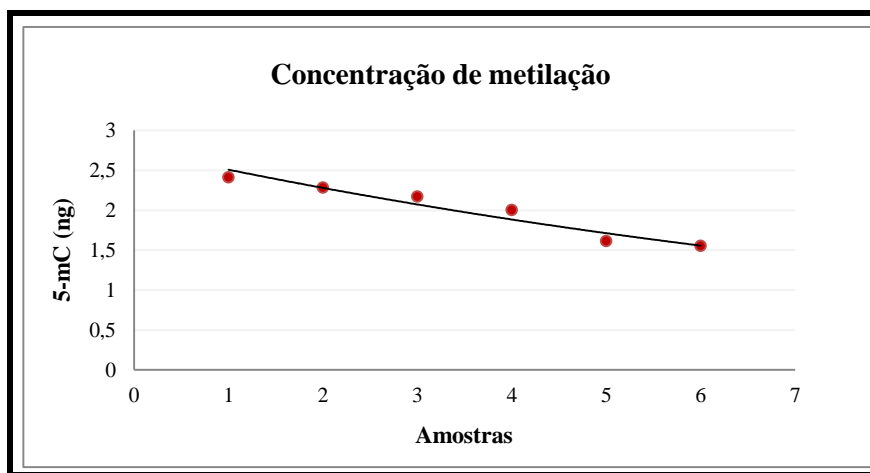


Figura 26 - Gráfico representativo da concentração de metilação do ADN extraído pelo método Oragene® DNA/saliva (DNA Genotek), nas respetivas amostras biológicas.

Adicionalmente, a metilação do ADN foi analisada nas amostras extraídas pelo método adaptado de Chelex® 100 e, tal como verificado com as amostras extraídas por Oragene® DNA/saliva (DNA Genotek), observou-se uma diminuição dos valores de concentração da metilação com o aumento da idade (Tabela 36 e Figura 27). No entanto, a amostra da criança de 4 anos apresentou um valor de concentração da metilação global bastante superior comparativamente

às restantes amostras em estudo, o que não se verificou com a mesma amostra extraída por Oragene® DNA/saliva (DNA Genotek).

Tabela 36 - Dados obtidos relativamente ao estado de metilação global do ADN recolhido *OmniSwab*TM (Whatman®) extraído pelo método adaptado de Chelex® 100.

| Dados da metilação global | | | | |
|---------------------------|--------------|----------|-----------|----------|
| Amostra | Idade (anos) | Média OD | 5-mC (ng) | 5-mC (%) |
| EPI_CxS-1 | 4 | 0,814 | 2,056 | 3,462 |
| EPI_CxS-2 | 23 | 0,389 | 0,901 | 1,210 |
| EPI_CxS-3 | 32 | 0,364 | 0,832 | 0,801 |
| EPI_CxS-4 | 32 | 0,342 | 0,774 | 0,545 |
| EPI_CxS-5 | 47 | 0,195 | 0,373 | 0,448 |
| EPI_CxS-6 | 81 | 0,134 | 0,209 | 0,184 |

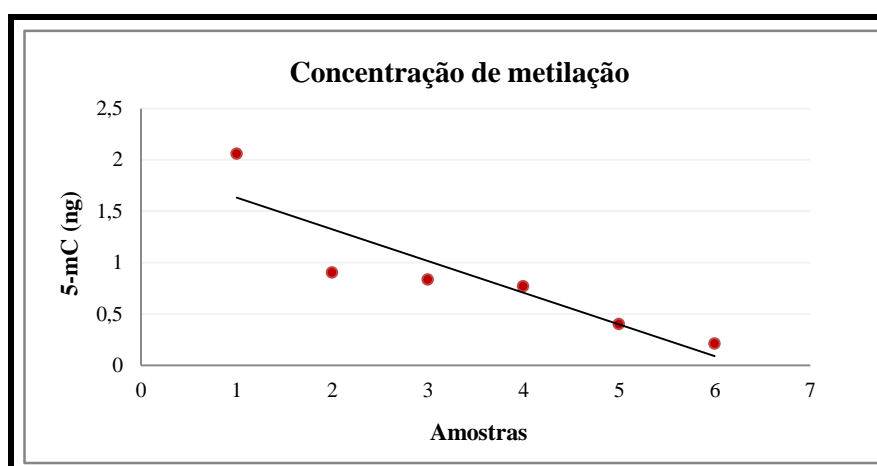


Figura 27 - Gráfico representativo da concentração de metilação do ADN extraído pelo método adaptado de Chelex® 100, nas respetivas amostras biológicas.

5. Conclusões

Em Ciências Forenses, a estimativa da idade de vítimas ou suspeitos pode facilitar a investigação e restringir a procura, auxiliando na resolução de crimes. Por outro lado, esta pode ser fulcral em questões sociopolíticas que visam impedir a adulteração da idade em indivíduos vivos. A previsão da idade é realizada com recurso a métodos tradicionais, como por exemplo a morfologia do indivíduo, requerendo técnicos especializados. Contudo, na maioria dos crimes ocorridos, o perpetrador fugiu após cometer o delito, deixando no local algumas evidências tais como saliva, sangue ou outros fluídos, dependendo do tipo de crime. A análise forense do ADN permitiu a obtenção de perfis genéticos únicos para cada indivíduo a partir do ADN extraído do material biológico, permitindo identificar o suspeito. Quando o suspeito não é identificado, poderão ser estimadas as suas características físicas, como por exemplo a idade. Atualmente, a estimativa da idade é realizada através de métodos bioquímicos e moleculares, porém estes métodos apresentam várias limitações práticas e baixa precisão na estimativa da idade em humanos. A pesquisa de metodologias alternativas para a previsão da idade relacionou o envelhecimento com a alteração de padrões de metilação do ADN de promotores de genes.

Nesta dissertação, foram estudados 3 *loci* relacionados com a idade e que foram previamente descritos por Bocklandt et al. (2011). No entanto, neste estudo substituímos o método de análise da metilação utilizado por Bocklandt et al. (2011) - a pirosequenciação, por uma abordagem HRM dos resultados obtidos após a amplificação (Bocklandt, Lin, and Sehl 2011). Numa primeira etapa, procedemos à otimização de uma metodologia a vários níveis, desde os métodos de extração, conversão por bissulfito e amplificação por PCR para a respetiva análise HRM dos padrões de metilação. Um dos fatores fulcrais para o sucesso da metodologia relacionou-se com a conversão por bissulfito, uma vez que se observou uma diminuição na concentração de ADN, após a conversão, o que comprova que este tratamento químico introduz várias quebras na cadeia de ADN, tornando altamente fragmentado. Este facto conduz à elevada degradação deste ácido nucleico, a qual afeta a técnica de PCR, uma vez que ocorre uma diminuição das moléculas de ADN disponíveis para a amplificação (Ehrich et al. 2007). Uma vez que nem todos os métodos de extração permitem a obtenção de elevadas concentrações de ADN, a amplificação de amostras com concentrações baixas poderá estar comprometida e, consequentemente a análise HRM revelará resultados inconsistentes para as várias amostras do mesmo indivíduo. Desta forma, a análise HRM verificou que duas das metodologias testadas, extração Oragene® DNA/saliva (DNA Genotek) e por Chelex® 100 (*OmniSwab*TM) e conversão pelo *kit EZ DNA Methylation-Gold*TM (Zymo Research), não apresentaram diferenças significativas na avaliação dos padrões de metilação dos

promotores de genes estudados, para o mesmo indivíduo, referentes aos métodos de recolha/armazenamento e extração do material genético.

Assim, foram testadas estas duas metodologias num conjunto de seis amostras para a estimativa da idade, segundo o estado de metilação dos fragmentos amplificados para os promotores. A metodologia que recorreu à extração pelo método de Chelex® 100 (*OmniSwabTM*) não diferenciou corretamente a amostragem por idades. Por outro lado, a outra metodologia testada (extração por Oragene® DNA/saliva e conversão pelo *kit EZ DNA Methylation-GoldTM*) permitiu a distinção das amostras em grupos etários para o marcador EDARADD, e para os restantes *loci* apenas foi possível distinguir idosos do restante conjunto de amostras. Desta forma, pode concluir-se que esta foi a melhor metodologia testada para a previsão da idade, embora que não permita obter uma taxa de erro de 5,2 anos como obtida pela técnica de pirosequenciação (Bocklandt, Lin, and Sehl 2011). No entanto, esta metodologia apenas poderá ser utilizada por indivíduos vivos, excluindo a possibilidade da determinação da idade em vestígios forenses.

Por último, analisamos a concentração global de metilação do ADN da amostragem e comprovamos que a concentração de 5-metilcitosina diminui ao longo o envelhecimento, tal como descrito na literatura (Fuke et al. 2004; Jones, Goodman, and Kobor 2015; Jung and Pfeifer 2015).

Em suma, a abordagem HRM apresentou várias limitações na estimativa da idade pela análise dos padrões de metilação dos promotores dos genes EDARADD, NPTX2 e TOM1L1. Todavia, os custos desta técnica são muito menores e requerem baixa instrumentalização, comparativamente à pirosequenciação. Para tal esta metodologia poderá ser utilizada como teste preliminar da previsão da idade, associada à quantificação da metilação global do ADN genómico.

6. Bibliografia

- Almén, Markus Sällman, Emil K. Nilsson, Josefin A. Jacobsson, Ineta Kalnina, Janis Klovins, Robert Fredriksson, and Helgi B. Schiöth. 2014. "Genome-Wide Analysis Reveals DNA Methylation Markers That Vary with Both Age and Obesity." *Gene* 548 (1): 61–67. doi:10.1016/j.gene.2014.07.009.
- Aubert, Geraldine, and Peter M Lansdorp. 2008. "Telomeres and Aging." *Physiological Reviews* 88 (2): 557–79. doi:10.1152/physrev.00026.2007.
- Aviv, Abraham. 2002. "Chronology versus Biology: Telomeres, Essential Hypertension, and Vascular Aging." *Hypertension* 40 (3): 229–32. doi:10.1161/01.HYP.0000027280.91984.1B.
- Bekaert, B., A. Kamalandua, S. C. Zapico, W. Van de Voorde, and R. Decorte. 2015. "A Selective Set of DNA-Methylation Markers for Age Determination of Blood, Teeth and Buccal Samples." *Forensic Science International: Genetics Supplement Series* 5. Elsevier Ireland Ltd: 144–45. doi:10.1016/j.fsigss.2015.09.058.
- Bekaert, Bram, Aubeline Kamalandua, Sara C. Zapico, Wim Van De Voorde, and Ronny Decorte. 2014. "Improved Age Determination of Blood and Teeth Samples Using a Selected Set of DNA Methylation Markers." *Epigenetics* 10 (10): 922–30. doi:10.1080/15592294.2015.1080413.
- Bell, Jordana T., Pei Chien Tsai, Tsun Po Yang, Ruth Pidsley, James Nisbet, Daniel Glass, Massimo Mangino, et al. 2012. "Epigenome-Wide Scans Identify Differentially Methylated Regions for Age and Age-Related Phenotypes in a Healthy Ageing Population." *PLoS Genetics* 8 (4). doi:10.1371/journal.pgen.1002629.
- Bell, Jordana T, and Tim D Spector. 2011. "A Twin Approach to Unraveling Epigenetics." *Trends in Genetics : TIG* 27 (3). Elsevier Ltd: 116–25. doi:10.1016/j.tig.2010.12.005.
- Bird, Adrian. 2002. "DNA Methylation Patterns and Epigenetic Memory." *Genes and Development*. doi:10.1101/gad.947102.
- Bocklandt, Sven, Wen Lin, and ME Sehl. 2011. "Epigenetic Predictor of Age." *PloS One* 6 (6): 1–6. doi:10.1371/Citation.
- Borrmann, H I M, C Cattaneo, and MJ Collins. 2000. "R E V I E W A R T I C L E Age Estimation : The State of the Art in Relation to the Specific Demands of Forensic Practise." *International Journal of Legal Medicine*, 129–36. <http://link.springer.com/article/10.1007/s004140050283>.
- Carriço, J. A., A. J. Sabat, A. W. Friedrich, M. Ramirez, and ESCMID Study Group for Epidemiological Markers (ESGEM). 2013. "Bioinformatics in Bacterial Molecular Epidemiology and Public Health: Databases, Tools and the next-Generation Sequencing Revolution." *Euro Surveillance : Bulletin Europe en Sur Les Maladies Transmissibles = European Communicable Disease Bulletin* 18 (4): 20382. doi:10.1038/jid.2013.1.Research.
- Choi, Ajin, KJ Shin, WI Yang, and HY Lee. 2014. "Body Fluid Identification by Integrated Analysis of DNA Methylation and Body Fluid-Specific Microbial DNA." *International Journal of Legal Medicine* 128 (1): 33–41. doi:10.1007/s00414-013-0918-4.
- Czyz, Witold, Julia M Morahan, George C Ebers, and Sreeram V Ramagopalan. 2012. "Genetic,

- Environmental and Stochastic Factors in Monozygotic Twin Discordance with a Focus on Epigenetic Differences.” *BMC Medicine* 10 (1): 93. doi:10.1186/1741-7015-10-93.
- Delaney, Colin, and Ann Arbor. 2015. “Immunosenescence” 1343: 249–64. doi:10.1007/978-1-4939-2963-4.
- Dong, Li, Long-Bao Lv, and Ren Lai. 2012. [*Molecular Cloning of Tupaia Belangeri Chinensis Neuropeptide Y and Homology Comparison with Other Analogues from Primates*]. *Zool. Res.* Vol. 33. doi:10.3724/SP.J.1141.2012.01075.
- Dugast-darzacq, Claire, and Thierry Grange. 2009. “DNA Methylation.” *Methods* 507: 281–303. doi:10.1007/978-1-59745-522-0.
- Ehrich, Mathias, Scott Zoll, Sudipto Sur, and Dirk van den Boom. 2007. “A New Method for Accurate Assessment of DNA Quality after Bisulfite Treatment.” *Nucleic Acids Research* 35 (5): 1–8. doi:10.1093/nar/gkl1134.
- Fernandez, Agustin F, Covadonga Huidobro, and Mario F Fraga. 2012. “De Novo DNA Methyltransferases: Oncogenes, Tumor Suppressors, or Both?” *Trends in Genetics : TIG* 28 (10). Elsevier Ltd: 474–79. doi:10.1016/j.tig.2012.05.006.
- Fraga, Mario F, Esteban Ballestar, Maria F Paz, Santiago Ropero, Fernando Setien, Maria L Ballestar, Damia Heine-Suñer, et al. 2005. “Epigenetic Differences Arise during the Lifetime of Monozygotic Twins.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (30): 10604–9. doi:10.1073/pnas.0500398102.
- Franklin, Daniel, and Jacqueline Noble. 2015. “Forensic Age Estimation in Living Individuals : Methodological Considerations in the Context of Medico-Legal Practice,” no. October. doi:10.2147/RRFMS.S75140.
- Frommer, M, L E McDonald, D S Millar, C M Collis, F Watt, G W Grigg, P L Molloy, and C L Paul. 1992. “A Genomic Sequencing Protocol That Yields a Positive Display of 5-Methylcytosine Residues in Individual DNA Strands.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89 (5): 1827–31. doi:10.1073/pnas.89.5.1827.
- Frumkin, Dan, Adam Wasserstrom, Bruce Budowle, and Ariane Davidson. 2011. “DNA Methylation-Based Forensic Tissue Identification.” *Forensic Science International. Genetics* 5 (5). Elsevier Ireland Ltd: 517–24. doi:10.1016/j.fsigen.2010.12.001.
- Frumkin, Dan, Adam Wasserstrom, Ariane Davidson, and Arnon Grafit. 2010. “Authentication of Forensic DNA Samples.” *Forensic Science International: Genetics* 4 (2): 95–103. doi:10.1016/j.fsigen.2009.06.009.
- Fuke, C., M. Shimabukuro, A. Petronis, J. Sugimoto, T. Oda, K. Miura, T. Miyazaki, C. Ogura, Y. Okazaki, and Yoshihiro Jinno. 2004. “Age Related Changes in 5-Methylcytosine Content in Human Peripheral Leukocytes and Placentas: An HPLC-Based Study.” *Annals of Human Genetics* 68 (3): 196–204. doi:10.1046/j.1529-8817.2004.00081.x.
- Genereux, Diane P., Winslow C. Johnson, Alice F. Burden, Reinhard Stöger, and Charles D. Laird. 2009. “Erratum: Errors in the Bisulfite Conversion of DNA: Modulating Inappropriate- and Failed-Conversion Frequencies (Nucleic Acids Research (2008) Vol. 37 (e150)).” *Nucleic Acids Research* 37 (15): 5235. doi:10.1093/nar/gkp637.

- Grundberg, Elin, Eshwar Meduri, Johanna K. Sandling, K. Hedman, Sarah Keildson, Alfonso Buil, Stephan Busche, et al. 2013. "Global Analysis of Dna Methylation Variation in Adipose Tissue from Twins Reveals Links to Disease-Associated Variants in Distal Regulatory Elements." *American Journal of Human Genetics* 93 (5): 876–90. doi:10.1016/j.ajhg.2013.10.004.
- Gunn, Peter, Simon Walsh, and Claude Roux. 2014. "The Nucleic Acid Revolution Continues - Will Forensic Biology Become Forensic Molecular Biology?" *Frontiers in Genetics* 5 (March): 44. doi:10.3389/fgene.2014.00044.
- Gutierrez-Rodrigues, Fernanda, Barbara A. Santana-Lemos, Priscila S. Scheucher, Raquel M. Alves-Paiva, and Rodrigo T. Calado. 2014. "Direct Comparison of Flow-FISH and qPCR as Diagnostic Tests for Telomere Length Measurement in Humans." *PLoS ONE* 9 (11): 1–9. doi:10.1371/journal.pone.0113747.
- Hannum, Gregory, Justin Guinney, Ling Zhao, Li Zhang, Guy Hughes, Srinivas Sadda, Brandy Klotzle, et al. 2013. "Genome-Wide Methylation Profiles Reveal Quantitative Views of Human Aging Rates." *Molecular Cell* 49 (2): 359–67. doi:10.1016/j.molcel.2012.10.016.
- Hanson, Erin K., and Jack Ballantyne. 2013. "Rapid and Inexpensive Body Fluid Identification by RNA Profiling-Based Multiplex High Resolution Melt (HRM) Analysis." *F1000Research*, no. 0: 1–22. doi:10.12688/f1000research.2-281.v1.
- Hernando-Herraez, Irene, Raquel Garcia-Perez, Andrew J. Sharp, and Tomas Marques-Bonet. 2015. "DNA Methylation: Insights into Human Evolution." *PLoS Genetics* 11 (12): 1–12. doi:10.1371/journal.pgen.1005661.
- Heyn, Holger, Sebastian Moran, Irene Hernando-Herraez, Sergi Sayols, Antonio Gomez, Juan Sandoval, Dave Monk, et al. 2013. "DNA Methylation Contributes to Natural Human Variation." *Genome Research* 23 (9): 1363–72. doi:10.1101/gr.154187.112.
- Higuchi, Russell, Carita Fockler, and Gavin Dollinger. 1993. "Kinetic PCR Analysis: Real-Time Monitoring of DNA Amplification Reactions." *Nature Biotechnology* 11 (9): 1026–30. doi:10.1038/nbt0993-1026.
- Horvath, Steve. 2013. "DNA Methylation Age of Human Tissues and Cell Types." *Genome Biology* 14 (10): R115. doi:10.1186/gb-2013-14-10-r115.
- Huang, Yun, Jing Yan, Jiayi Hou, Xiaodan Fu, Luyao Li, and Yiping Hou. 2015. "Developing a DNA Methylation Assay for Human Age Prediction in Blood and Bloodstain." *Forensic Science International: Genetics* 17. Elsevier Ireland Ltd: 129–36. doi:10.1016/j.fsigen.2015.05.007.
- Jarman, Simon N., Andrea M. Polanowski, Cassandra E. Faux, Jooke Robbins, Ricardo De Paoli-Iseppi, Mark Bravington, and Bruce E. Deagle. 2015. "Molecular Biomarkers for Chronological Age in Animal Ecology." *Molecular Ecology* 24 (19): 4826–47. doi:10.1111/mec.13357.
- Jiang, H., Z. Ju, and K. L. Rudolph. 2007. "Telomere Shortening and Ageing." *Zeitschrift Fur Gerontologie Und Geriatrie* 40 (5): 314–24. doi:10.1007/s00391-007-0480-0.
- Jones, Meaghan J., Sarah J. Goodman, and Michael S. Kobor. 2015. "DNA Methylation and Healthy Human Aging." *Aging Cell* 14 (6): 924–32. doi:10.1111/accel.12349.
- Joshi, Mohini, and J.D. Deshpande. 2010. "Polymerase Chain Reaction: Methods, Pr." *International Journal of Biomedical Research* 1 (5): 81–97. doi:http://dx.doi.org/10.7439/ijbr.v2i1.83.

- Jung, Marc, and Gerd P Pfeifer. 2015. "Aging and DNA Methylation." *BMC Biology* 13 (1): 7. doi:10.1186/s12915-015-0118-4.
- Kader, Farzeen, and Meenu Ghai. 2015. "DNA Methylation and Application in Forensic Sciences." *Forensic Science International* 249 (April). Elsevier Ireland Ltd: 255–65. doi:10.1016/j.forsciint.2015.01.037.
- Kayser, M, and P de Knijff. 2011. "Improving Human Forensics through Advances in Genetics, Genomics and Molecular Biology." *Nat Rev Genet* 12 (3). Nature Publishing Group: 179–92. doi:10.1038/nrg2952.
- Koch, Carmen M., and Wolfgang Wagner. 2011. "Epigenetic-Aging-Signature to Determine Age in Different Tissues." *Aging* 3 (10): 1018–27. doi:100395 [pii].
- Kurdyukov, Sergey, and Martyn Bullock. 2016. "DNA Methylation Analysis: Choosing the Right Method." *Biology* 5 (1): 3. doi:10.3390/biology5010003.
- Lam, Lucia L, Eldon Emberly, Hunter B Fraser, Sarah M Neumann, Edith Chen, Gregory E Miller, and Michael S Kobor. 2012. "Factors Underlying Variable DNA Methylation in a Human Community Cohort." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 Suppl (October): 17253–60. doi:10.1073/pnas.1121249109.
- Lardenoije, Roy, Artemis Iatrou, Gunter Kenis, Konstantinos Kompotis, Harry W M Steinbusch, Diego Mastroeni, Paul Coleman, et al. 2015. "The Epigenetics of Aging and Neurodegeneration." *Progress in Neurobiology* 131. Elsevier Ltd: 21–64. doi:10.1016/j.pneurobio.2015.05.002.
- Lee, Hwan Young, Myung Jin Park, Ajin Choi, Ja Hyun An, Woo Ick Yang, and Kyoung Jin Shin. 2012. "Potential Forensic Application of DNA Methylation Profiling to Body Fluid Identification." *International Journal of Legal Medicine* 126 (1): 55–62. doi:10.1007/s00414-011-0569-2.
- Lynnerup, Niels, Henrik Kjeldsen, Ralf Zweihoff, Steffen Heegaard, Christina Jacobsen, and Jan Heinemeier. 2010. "Ascertaining Year of Birth/age at Death in Forensic Cases: A Review of Conventional Methods and Methods Allowing for Absolute Chronology." *Forensic Science International* 201 (1–3). Elsevier Ireland Ltd: 74–78. doi:10.1016/j.forsciint.2010.03.026.
- Madi, Tania, Kuppureddi Balamurugan, Robin Bombardi, George Duncan, and Bruce McCord. 2012. "The Determination of Tissue-Specific DNA Methylation Patterns in Forensic Biofluids Using Bisulfite Modification and Pyrosequencing." *Electrophoresis* 33 (12): 1736–45. doi:10.1002/elps.201100711.
- Mastroeni, Diego, Andrew Grover, Elaine Delvaux, Charisse Whiteside, Paul D Coleman, and Joseph Rogers. 2011. "NIH Public Access" 31 (12): 2025–37. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2008.12.005.Epigenetic.
- Meissner, Christoph, and Stefanie Ritz-Timme. 2010. "Molecular Pathology and Age Estimation." *Forensic Science International* 203 (1–3). Elsevier Ireland Ltd: 34–43. doi:10.1016/j.forsciint.2010.07.010.
- Mullis, Kary B, Randall K Saik, David H Gelfand, Susanne Stoffel, Stephen J Scharf, Russell Higuchi, Glenn T Horn, and Henry A Erlich. 2000. "Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase" 979 (1986).
- Naito, E, K Dewa, H Yamanouchi, S Takagi, and R Kominami. 1993. "Sex Determination Using the Hypomethylation of a Human Macro-Satellite DXZ4 in Female Cells." *Nucleic Acids Res* 21 (10): 2533–34. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC309572/pdf/nar00059-0239.pdf>.

- Nakatome, Masato, Minami Orii, Makoto Hamajima, Yukari Hirata, Misato Uemura, Sayaka Hirayama, and Ichiro Isobe. 2011. "Methylation Analysis of Circadian Clock Gene Promoters in Forensic Autopsy Specimens." *Legal Medicine* 13 (4). Elsevier Ireland Ltd: 205–9. doi:10.1016/j.legalmed.2011.03.001.
- Newell-Price, J., Adrian J L Clark, and Peter King. 2000. "DNA Methylation and Silencing of Gene Expression." *Trends in Endocrinology and Metabolism*. doi:10.1016/S1043-2760(00)00248-4.
- Noren Hooten, Nicole, Megan Fitzpatrick, William H. Wood, Supriyo De, Ngozi Ejiogu, Yongqing Zhang, Julie A. Mattison, Kevin G. Becker, Alan B. Zonderman, and Michele K. Evans. 2013. "Age-Related Changes in microRNA Levels in Serum." *Aging* 5 (10): 725–40. doi:100603 [pii].
- Nunes, Ana P, Isabel O Oliveira, Betânia R Santos, Cristini Millech, Liziane P Silva, David A González, Pedro C Hallal, Ana M B Menezes, Cora L Araújo, and Fernando C Barros. 2012. "Quality of DNA Extracted from Saliva Samples Collected with the Oragene™ DNA Self-Collection Kit." *BMC Medical Research Methodology* 12 (1). BioMed Central Ltd: 65. doi:10.1186/1471-2288-12-65.
- Ou, Xue-ling, Jun Gao, Huan Wang, Hong-sheng Wang, Hui-ling Lu, and Hong-yu Sun. 2012. "Predicting Human Age with Bloodstains by sjTREC Quantification." *PloS One* 7 (8): e42412. doi:10.1371/journal.pone.0042412.
- Overhoff, Marita G., James C. Garbe, James Koh, Martha R. Stampfer, David H. Beach, and Cleo L. Bishop. 2014. "Cellular Senescence Mediated by p16INK4A-Coupled miRNA Pathways." *Nucleic Acids Research* 42 (3): 1606–18. doi:10.1093/nar/gkt1096.
- Park, Lara K, Simonetta Friso, and Sang-Woon Choi. 2012. "Nutritional Influences on Epigenetics and Age-Related Disease." *The Proceedings of the Nutrition Society* 71 (1): 75–83. doi:10.1017/S0029665111003302.
- Patterson, Kate, Laura Molloy, Wenjia Qu, and Susan Clark. 2011. "DNA Methylation: Bisulphite Modification and Analysis." *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, no. 56(January): 1–9. doi:10.3791/3170.
- Pilin, Alexander, Frantisek Pudil, and Vladimír Bencko. 2007. "Changes in Colour of Different Human Tissues as a Marker of Age." *International Journal of Legal Medicine* 121 (2): 158–62. doi:10.1007/s00414-006-0136-4.
- Ramsahoye, Bernard H, Detlev Binarskiewicz, Frank Lyko, Victoria Clark, Adrian P Bird, and Rudolf Jaenisch. 2000. "Non-CpG Methylation Is Prevalent in Embryonic Stem Cells and May Be Mediated by DNA Methyltransferase 3a." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (10): 5237–42. doi:10.1073/pnas.97.10.5237.
- Rando, Oliver J, and Kevin J Verstrepen. 2007. "Timescales of Genetic and Epigenetic Inheritance." *Cell* 128 (4): 655–68. doi:10.1016/j.cell.2007.01.023.
- Reik, W, and J Walter. 2001. "Genomic Imprinting: Parental Influence on the Genome." *Nature Reviews. Genetics* 2 (1): 21–32. doi:10.1038/35047554.
- Ritz-Timme, S, I Laumeier, and M Collins. 2003. "Age Estimation Based on Aspartic Acid Racemization in Elastin from the Yellow Ligaments." *International Journal of Legal Medicine* 117 (2): 96–101. doi:10.1007/s00414-002-0355-2.
- Saeed, Maria, Rebecca M. Berlin, and Tracey Dawson Cruz. 2012. "Exploring the Utility of Genetic Markers

- for Predicting Biological Age.” *Legal Medicine* 14 (6). Elsevier Ireland Ltd: 279–85. doi:10.1016/j.legalmed.2012.05.003.
- Shen, Lanlan, and Robert A Waterland. 2007. “Methods of DNA Methylation Analysis.” *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 10 (5): 576–81. doi:10.1097/MCO.0b013e3282bf6f43.
- Steegenga, Wilma T., Mark V. Boekschoten, Carolien Lute, Guido J. Hooiveld, Philip J. De Groot, Tiffany J. Morris, Andrew E. Teschendorff, Lee M. Butcher, Stephan Beck, and Michael Müller. 2014. “Genome-Wide Age-Related Changes in DNA Methylation and Gene Expression in Human PBMCs.” *Age* 36 (3): 1523–40. doi:10.1007/s11357-014-9648-x.
- Stewart, Leander, Neil Evans, Kimberley J. Bexon, Dieudonne J. Van Der Meer, and Graham A. Williams. 2015. “Differentiating between Monozygotic Twins through DNA Methylation-Specific High-Resolution Melt Curve Analysis.” *Analytical Biochemistry* 476. Elsevier Inc.: 36–39. doi:10.1016/j.ab.2015.02.001.
- St-Pierre, Julie, Julie A. Buckingham, Stephen J. Roebuck, and Martin D. Brand. 2002. “Topology of Superoxide Production from Different Sites in the Mitochondrial Electron Transport Chain.” *Journal of Biological Chemistry* 277 (47): 44784–90. doi:10.1074/jbc.M207217200.
- Sun, Wei, Jing-jian Li, Chao Xiong, Bo Zhao, and Shi-lin Chen. 2016. “The Potential Power of Bar-HRM Technology in Herbal Medicine Identification.” *Frontiers in Plant Science* 7 (March): 1–10. doi:10.3389/fpls.2016.00367.
- Szyf, Moshe. 2011. “DNA Methylation, the Early-Life Social Environment and Behavioral Disorders.” *Journal of Neurodevelopmental Disorders* 3 (3): 238–49. doi:10.1007/s11689-011-9079-2.
- Tammen, SA, S Friso, and SW Choi. 2013. “Epigenetics: The Link between Nature and Nurture.” *Molecular Aspects of Medicine* 34 (4): 753–64. doi:10.1016/j.mam.2012.07.018.Epigenetics.
- Tollefsbol, Trygve O. 2004. “Epigenetics Protocols.” *Platelets* 287 (18): 316. doi:10.4081/ejh.2012.br8.
- Triantaphyllopoulos, Kostas A., Ioannis Ikonomopoulos, and Andrew J. Bannister. 2016. “Epigenetics and Inheritance of Phenotype Variation in Livestock.” *Epigenetics & Chromatin* 9 (1). BioMed Central: 31. doi:10.1186/s13072-016-0081-5.
- Vidaki, Athina, Barbara Daniel, and Denise Syndercombe Court. 2013. “Forensic DNA Methylation Profiling--Potential Opportunities and Challenges.” *Forensic Science International. Genetics* 7 (5). Elsevier Ireland Ltd: 499–507. doi:10.1016/j.fsigen.2013.05.004.
- Vijg, Jan, and Judith Campisi. 2008. “Puzzles, Promises and a Cure for Ageing.” *Nature* 454 (7208): 1065–71. doi:10.1038/nature07216.
- Vlassara, Helen, and Jaime Uribarri. 2014. “Advanced Glycation End Products (AGE) and Diabetes: Cause, Effect, or Both?” *Current Diabetes Reports* 14 (1): 1–17. doi:10.1007/s11892-013-0453-1.
- Waddington, C H. 2012. “The Epigenotype. 1942.” *International Journal of Epidemiology* 41 (1): 10–13. doi:10.1093/ije/dyr184.
- Walsh, P Sean, David A Metzger, and Russell Higuchi. 2013. “Biotechniques 30th Anniversary Gem Chelex 100 as a Medium for Simple Extraction of DNA for PCR-Based Typing from Forensic Material.” *BioTechniques* 54 (3): 506–13. doi:10.2144/000113897.
- Weidner, Carola Ingrid, Qiong Lin, Carmen Maike Koch, Lewin Eisele, Fabian Beier, Patrick Ziegler, Dirk

- Olaf Bauerschlag, et al. 2014. "Aging of Blood Can Be Tracked by DNA Methylation Changes at Just Three CpG Sites." *Genome Biology* 15 (2): R24. doi:10.1186/gb-2014-15-2-r24.
- Wojdacz, Tomasz K., and Alexander Dobrovic. 2007. "Methylation-Sensitive High Resolution Melting (MS-HRM): A New Approach for Sensitive and High-Throughput Assessment of Methylation." *Nucleic Acids Research* 35 (6). doi:10.1093/nar/gkm013.
- Wojdacz, Tomasz K, Alexander Dobrovic, and Lise Lotte Hansen. 2008. "Methylation-Sensitive High-Resolution Melting." *Nature Protocols* 3 (12): 1903–8. doi:10.1038/nprot.2008.191.
- Wojdacz, Tomasz K, and Lise Lotte Hansen. 2006. "Techniques Used in Studies of Age-Related DNA Methylation Changes." *Annals of the New York Academy of Sciences* 1067 (May): 479–87. doi:10.1196/annals.1354.069.
- Worm, J., A. Aggerholm, and P. Guldberg. 2001. "In-Tube DNA Methylation Profiling by Fluorescence Melting Curve Analysis." *Clinical Chemistry* 47 (7): 1183–89.
- Xu, Cheng, Hongzhu Qu, Guangyu Wang, Bingbing Xie, Yi Shi, Yaran Yang, Zhao Zhao, et al. 2015. "A Novel Strategy for Forensic Age Prediction by DNA Methylation and Support Vector Regression Model." *Scientific Reports* 5 (November). Nature Publishing Group: 17788. doi:10.1038/srep17788.
- Yi, Shao Hua, Yun Shu Jia, Kun Mei, Rong Zhi Yang, and Dai Xin Huang. 2015. "Age-Related DNA Methylation Changes for Forensic Age-Prediction." *International Journal of Legal Medicine* 129 (2): 237–44. doi:10.1007/s00414-014-1100-3.
- Yi, Shao Hua, Long Chang Xu, Kun Mei, Rong Zhi Yang, and Dai Xin Huang. 2014. "Isolation and Identification of Age-Related DNA Methylation Markers for Forensic Age-Prediction." *Forensic Science International: Genetics* 11 (1). Elsevier Ireland Ltd: 117–25. doi:10.1016/j.fsigen.2014.03.006.
- Zapico, Sara C, and Douglas H Ubelaker. 2015. "Relationship Between Mitochondrial DNA Mutations and Aging. Estimation of Age-at-Death." *The Journals of Gerontology. Series A, Biological Sciences and Medical Sciences* 71 (4): 445–50. doi:10.1093/gerona/glv115.
- Zbieć-Piekarska, Renata, Magdalena Spólnicka, Tomasz Kupiec, Agnieszka Parys-Proszek, Żanetta Makowska, Anna Pałeczka, Krzysztof Kucharczyk, Rafał Płoski, and Wojciech Branicki. 2015. "Development of a Forensically Useful Age Prediction Method Based on DNA Methylation Analysis." *Forensic Science International: Genetics* 17: 173–79. doi:10.1016/j.fsigen.2015.05.001.
- Zubakov, D., F. Liu, M. C. Van Zelm, J. Vermeulen, B. A. Oostra, C. M. Van Duijn, G. J. Driessen, J. J M Van Dongen, M. Kayser, and A. W. Langerak. 2010. "Estimating Human Age from T-Cell DNA Rearrangements." *Current Biology* 20 (22). Elsevier: R970–71. doi:10.1016/j.cub.2010.10.022.

Anexos

Anexo I – Consentimento informado utilizado na recolha de amostras

Ficha De Dados Antropológicos

(Para Fins de Investigação Científica)

A preencher pelo dador:

| | |
|-------------------------|--|
| Ficha | |
| Amostra | |
| Data de colheita | |
| Colector | |

Identificação do Dador

| | |
|-------------------------------------|--|
| Nome | |
| Data de Nascimento | |
| Género (Masculino/Feminino) | |
| Naturalidade (freguesia e concelho) | |
| Residência Atual | |
| Observações (Doenças): | |

Outras Informações

| Pai | | Mãe | |
|--|--|--|--|
| Nome | | Nome | |
| Naturalidade (freguesia e concelho) | | Naturalidade (freguesia e concelho) | |
| Avô Paterno | | Avô Materno | |
| Nome | | Nome | |
| Naturalidade (freguesia e concelho) | | Naturalidade (freguesia e concelho) | |
| Avó Paterna | | Avó Materna | |
| Nome | | Nome | |
| Naturalidade (freguesia e concelho) | | Naturalidade (freguesia e concelho) | |

Declaração

Para os devidos efeitos eu, _____, abaixo assinado, declaro autorizar a colheita de amostras de saliva (epitélio da boca) para fins de estudo científico do projeto de estudo de marcadores epigenéticos da idade realizado pelo Professor Doutor Luís Souto da Universidade de Aveiro, Portugal. A amostra recolhida será tratada nos laboratórios e instituições a indicar e sob responsabilidade do Prof. Doutor Luís Souto da Universidade de Aveiro, Portugal.

Fui informado dos objetivos deste projeto e não fui coagido nem recebi qualquer pagamento ou benefício por esta colheita. Fui informado de que posso anular este consentimento sem qualquer penalização ou desvantagem e de que a minha privacidade será protegida uma vez que os dados recolhidos são confidenciais e não serão usados para qualquer outro fim que não os do presente projeto de investigação.

Local: _____

Data: ____/____/____

Assinatura: _____

Anexo II – Proposta de Artigo

PREDICTING AGE THROUGH DNA METHYLATION BY HIGH-RESOLUTION MELTING ANALYSIS

Sílvia Vale¹ Luís Souto¹

¹Department of Biology, University of Aveiro

Abstract

Throughout the lifetime, a stochastic process influenced by heredity, environment, lifestyle and disease leads to gradual alterations of biomolecules at molecular and cellular levels – aging. These changes can aid in forensic investigations to estimate the age of individuals and their identification by morphological, biochemical and molecular methods. However, all of these biomarkers have low precision and practical limitations.

One of these epigenetic modifications has been correlated with age is DNA methylation, which global level of methylation decreases as a person ages. Therefore, several studies have analyzed the methylation patterns of many gene promoters to create a robust model for predicting age.

In this study, we evaluated a new approach to the analysis of methylation status of three gene promoters (EDARADD, NPTX2 and TOM1L1) – High-Resolution Melting. According to methylation status of three markers, this methodology allowed the differentiation of six samples (4 - 81) in age groups, revealing some technical inaccuracy to estimate age.

Keywords: DNA methylation; Age; High-Resolution Melting Analysis (HRM); Forensic Genetics.

Abbreviations used: HRM, high-resolution melting; qPCR, quantitative polymerase chain reaction

1. Introduction

Aging is a process regulated by development and causes a range of morphological, biochemical and molecular alterations which accumulate over a lifetime. The accumulation of DNA damage and protein alterations can be quantified and serve as biomarkers of human age [1]. Mitochondrial deletions, telomere shortening, increased aspartic acid racemization (AAR), advanced glycation endproducts (AGEs), signal joint T-cell receptor (TCR) rearrangement excision circle (sjTRECs),

and RNA biomarkers are a few examples of methods for predicting age [2,3]. However, all of these have relatively low precision and practical limitations [3].

The accumulating evidence suggests that aging is a process tightly regulated by specific epigenetic modifications. One particular area showing promise about aging is DNA methylation. The global DNA methylation level decreases with aging in human tissues as a consequence of progressive loss of DNMT efficiency. Based on three *loci* (EDARADD, NPTX2 and TOM1L1), Bocklandt et al. (2011) created a regression model that could predict an individual's age to average accuracy of 5.2 years, revealing the potential value of methylation for predicting biological age [4]. In this study, we used the promoters' genes identified by Bocklandt et al. (2011) to predict the human age in saliva by qPCR and HRM analysis. Consequently, the aim of this study was to evaluate whether HRM will allow predict age.

2. Material and Methods

2.1. Sample collection and Extraction

We collected saliva samples from six individuals (4-81 years old) by Oragene[®] DNA (DNA Genotek) after informed consent was obtained. Genomic DNA was extracted according to the manufacturer's instructions.

2.2. DNA quantification

DNA concentration was measured using NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific). This allows the normalization of DNA samples prior and after bisulfite treatment.

2.3. Bisulfite treatment

For DNA methylation analysis, we performed bisulfite conversion DNA. In this step, all nonmethylated cytosines were converted in uracils keeping 5-methylcytosines intact. DNA bisulfite modification was performing using EZ DNA Methylation-Gold[™] Kit (Zymo Research) as per the manufacturer's recommendations.

2.4. Amplification

DNA samples underwent amplification for each gene promoters, in different conditions. NPTX2 and TOM1L1 were amplified by nested-PCR, initially by conventional PCR iCycler[™] (Bio-Rad). The reactions were performed in 25 µL volume and contained *Taq PCR Core* (Qiagen), 0.3 µM of each forward and reverse primer (Table 1) and 20 ng of the DNA template. The PCR

conditions were: initial denaturation at 95 °C for 5 min, followed by 35 cycles at 95 °C for 5 s, 60 s at the primer's specific annealing temperature (Table 1) and DNA extension at 72 °C for 10 min.

Table 1 - Promoters genes (NPTX2 and TOM1L1): primer sequences and annealing temperature for PCR amplification.

| Gene Promoter | Primer | Sequence 5' – 3' | Annealing Temperature (°C) | Reference |
|---------------|----------------|---------------------------------------|----------------------------------|-----------|
| NPTX2 | <i>Forward</i> | TAG TTT AAG AAA GGG | 42 | [4] |
| | <i>Reverse</i> | AAC TAT CCT AAA CCC CAA C | | |
| TOM1L1 | <i>Forward</i> | TTA ATT TAT TGT AGA ATT TT | 41 | [4] |
| | <i>Reverse</i> | AAA CCT CCT CTT CTA ATC TAT AAA AC | | |

The amplification by qPCR was performed for three *loci* (EDARADD, NPTX2 and TOM1L1). Reactions were carried out in 10 µL volume and contained Luminaris Color HRM Master Mix (Thermo Scientific), 0.3 µM of each forward and reverse primer (Table 1) and 20 ng of the DNA template. Real Time PCR was carried on CFX96™ Real-Time PCR (Bio-Rad), with following conditions: initial denaturation at 95 °C for 10 min., followed by 40 cycles at 95 °C for 10 s, 30 s at the primer's specific annealing temperature (Table 2) and DNA extension at 72 °C for 30 s.

Table 2 - Promoters genes (EDARADD, NPTX2 and TOM1L1): primer sequences and annealing temperature for qPCR amplification.

| Gene Promoter | Primer | Sequence 5' – 3' | Annealing Temperature (°C) | Reference |
|----------------|----------------|---|----------------------------------|-----------|
| EDARADD | <i>Forward</i> | GGT AGA TTA AGA GGA AGT TTA TTT TTT TAT | 57 | [4] |
| | <i>Reverse</i> | AAT ACC TCT CCC CAT CTA TTT AAT C | | |
| NPTX2 | <i>Forward</i> | GGT AGG AGA TTT TTG TTT | 53,5 | - |
| | <i>Reverse</i> | AAC TAT CCT AAA CCC CAA C | | |
| TOM1L1 | <i>Forward</i> | GGG GAG TGG AAT TAA ATA GGT GAA T | 46,5 | - |
| | <i>Reverse</i> | AAA CCT CCT CTT CTA ATC TAT AAA AC | | |

2.5. High-resolution melting curve analysis

HRM was conducted immediately after amplification with following conditions: 95 °C for 30 s and 50 °C for 30 s, followed by an increase in temperature from 65 °C to 95 °C, with 0.2 °C increment, each step with 10 s hold. The HRM data was analyzed using the *Precision Melt Analysis™ Software*.

3. Results

After bisulfite treatment and subsequent amplification of three gene promoters, the methylation status was evaluated by the analysis of melting curves through HRM.

As can be seen in Table 3, the sampling was differentiated in four clusters for EDARADD. The child's sample had the highest melting temperature (73,6 °C) and consequently was distinguished. The others samples had the same melting temperature (73,4 °C), however revealed significant differences in melting curves. The sample 2 was differentiated from the group of adults (32-47 years-old) and the elderly.

Table 3 – Data obtained by analyzing HRM for the marker EDARADD.

| Sample | Age | Melting temperature (°C) | Cluster | | Percent confidence (%) |
|--------|-----|--------------------------|---------|--|------------------------|
| 1 | 4 | 73,6 | 1 | | 99,1 |
| 2 | 23 | 73,4 | 2 | | 83,7 |
| 3 | 32 | 73,4 | 3 | | 97,7 |
| 4 | 32 | 73,4 | 3 | | 99,3 |
| 5 | 47 | 73,4 | 3 | | 99,5 |
| 6 | 81 | 73,4 | 4 | | 100,0 |

For the gene promotor NPTX2, the results suggest a clear division of sampling, the old sample (81 years-old) and the others (Table 4). It was noted that sample 3 had the lowest melting temperature (79 °C) and therefore it was separated into a group.

Table 4 - Data obtained by analyzing HRM for the marker NPTX2.

| Sample | Age | Melting temperature (°C) | Cluster | | Percent confidence (%) |
|--------|-----|--------------------------|---------|--|------------------------|
| 1 | 4 | 79,6 | 1 | | 98,4 |
| 2 | 23 | 79,6 | 1 | | 99,8 |
| 3 | 32 | 79 | 2 | | 100,0 |
| 4 | 32 | 79,6 | 1 | | 99,3 |
| 5 | 47 | 79,4 | 1 | | 98,1 |
| 6 | 81 | 79,2 | 3 | | 100,0 |

Table 5 shows the same clusters differentiation of the sampling observed in NPTX2 for TOM1L1. Although all samples had the same melting temperature, they showed significant differences in melting curve once the confidence percent were high.

Table 5 - Data obtained by analyzing HRM for the marker TOM1L1.

| Sample | Age | Melting temperature (°C) | Cluster | | Percent confidence (%) |
|--------|-----|--------------------------|---------|--|------------------------|
| 1 | 4 | 75,6 | 1 | | 99,4 |
| 2 | 23 | 75,6 | 1 | | 99,9 |
| 3 | 32 | 75,8 | 2 | | 99,6 |
| 4 | 32 | 75,8 | 1 | | 99,6 |
| 5 | 47 | 75,8 | 1 | | 99,7 |
| 6 | 81 | 75,8 | 3 | | 99,7 |

4. Discussion

The aim of this study was to evaluate the effectiveness of HRM analysis for predict age. This was achieved by isolating DNA from saliva samples, performing bisulfite treatment and carrying out HRM analysis on the EDARADD, NPTX2 and TOM1L1 amplicons.

EDARADD maker allowed the differentiation between age groups: children, youth, adults and seniors. The others markers (NPTX2 and TOM1L1) only distinguished elderly of the remaining sampling. Nevertheless, one sample (32 years-old) showed significant differences in melting curves for theses gene promoters and it was included in a different cluster. This sample may present an acceleration rate of aging in comparison with others, and thus the biological age may not match with chronological age [5].

Although, these results indicate that the analysis of DNA methylation patterns by a HRM approach allows the differentiation of sampling in age groups, but it is clear that this technique didn't get an error rate of 5.2 years as the pyrosequencing [4]. However, the cost of HRM analysis compared with sequencing is considerably cheaper and requires less sophisticated instrumentation [6]. Consequently, it can be used as a preliminary test supplemented with quantification of global DNA methylation since the concentration of methylation decrease as a person age [7,8].

Acknowledgements

We would like to thank the sample donors for their contribution to this study.

References

- [1] C. Xu, H. Qu, G. Wang, B. Xie, Y. Shi, Y. Yang, Z. Zhao, L. Hu, X. Fang, J. Yan, L. Feng, A novel strategy for forensic age prediction by DNA methylation and support vector regression model, *Sci. Rep.* 5 (2015) 17788. doi:10.1038/srep17788.
- [2] C. Meissner, S. Ritz-Timme, Molecular pathology and age estimation., *Forensic Sci. Int.* 203 (2010) 34–43. doi:10.1016/j.forsciint.2010.07.010.

- [3] M. Saeed, R.M. Berlin, T.D. Cruz, Exploring the utility of genetic markers for predicting biological age, *Leg. Med.* 14 (2012) 279–285. doi:10.1016/j.legalmed.2012.05.003.
- [4] S. Bocklandt, W. Lin, M. Sehl, Epigenetic predictor of age, *PLoS One.* 6 (2011) 1–6. doi:10.1371/Citation.
- [5] A. Aviv, Chronology versus biology: Telomeres, essential hypertension, and vascular aging, *Hypertension.* 40 (2002) 229–232. doi:10.1161/01.HYP.0000027280.91984.1B.
- [6] L. Stewart, N. Evans, K.J. Bexon, D.J. Van Der Meer, G.A. Williams, Differentiating between monozygotic twins through DNA methylation-specific high-resolution melt curve analysis, *Anal. Biochem.* 476 (2015) 36–39. doi:10.1016/j.ab.2015.02.001.
- [7] M.J. Jones, S.J. Goodman, M.S. Kabor, DNA methylation and healthy human aging, *Aging Cell.* 14 (2015) 924–932. doi:10.1111/accel.12349.
- [8] M. Jung, G.P. Pfeifer, Aging and DNA methylation., *BMC Biol.* 13 (2015) 7. doi:10.1186/s12915-015-0118-4.